

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Dpto. de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL  
REGULADOR ESENCIAL YycF DE  
*Streptococcus pneumoniae***

**TESIS DOCTORAL**

MARI LUZ MOHEDANO BONILLO  
Madrid, 2009



**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL  
REGULADOR ESENCIAL YycF DE  
*Streptococcus pneumoniae***

TESIS DOCTORAL

Mari Luz Mohedano Bonillo  
Tesis doctoral dirigida por: Dra. Paloma López García  
Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC



A mi familia y a Amadeo



Durante el recorrido de este viaje llamado tesis, he contado con el apoyo de las personas que se han encontrado a mi alrededor, y gracias a ellas el camino, no siempre tan fácil ni tan difícil, ha resultado ser una gran y bonita aventura, tanto profesional como personal. Por ello quisiera agradecerles su ayuda.

En primer lugar, y sin que suene a tópico, me gustaría agradecer a Paloma la confianza que ha depositado en mí desde el primer día, sus críticas constructivas y todo el tiempo que ha empleado en tratar de enseñarme, cosa que seguro no ha sido fácil. Por todo el tiempo que hemos pasado juntas en su despacho y por no tirar la toalla cuando yo estaba algo desesperada porque las cosas no salían como quería. Sin ella, esta tesis no sería nunca lo que es. Muchísimas gracias por todo. Gracias a Stephen Elson, por su inestimable ayuda en el conocimiento del descubrimiento y evolución de los antibióticos.

También me gustaría agradecer a Manolo que creyera en aquella chica que un día tocó a su puerta y le dijo que quería trabajar en investigación. Por recibirme aquel día, creer en mí y apoyarme. Sin él, tampoco estaría aquí en la actualidad.

Otro referente importante en mis inicios fue Palomita. Ella me guió en mis primeros pasos en el laboratorio y a pensar de una forma positiva a pesar de que los experimentos salieran mal. Fue “mi teacher”, mi amiga y compañera. Muchas gracias por todo.

Un laboratorio es un centro en el que el personal se renueva con bastante velocidad. Por eso, no sólo tengo que agradecer a las personas que se encuentran en la actualidad en el laboratorio, sino a todas aquellas que alguna vez formaron parte de él. Dentro de este grupo se encontrarían personas que me han ayudado mucho en este trabajo como Mauri, Nieves y Alicia, que no sólo me ayudaron a nivel laboral resolviendo muchas de mis “dudas” sino también en el ámbito personal, sacándome una sonrisa cuando era necesaria. A Mónica, que ha compartido conmigo parte del final de la elaboración de esta tesis y en la que se refleja parte de su esfuerzo. Su ayuda ha sido muy importante. También quiero agradecer a mis “nuevos compañeros”, Pascual, Mónica, Cristina y Begoña, con los que no he podido compartir muchos momentos, pero en los pocos que he compartido siempre me han recibido con palabras de ánimo y una sonrisa.

En este lugar de continuas idas y venidas se establece otro grupo, y es aquel que comprende a las personas que se han mantenido durante mi estancia en el laboratorio. A Lali, por no ser sólo compañera de laboratorio sino también una buena amiga. Siempre juntas, tanto al principio como al final (a ti te queda muy poquito para verte en esta situación). A Pilar, por su amistad, por sus consejos y por sus maravillosas correcciones en esta tesis. Una mención especial merece M<sup>a</sup> Angeles, por ser mi mejor apoyo en el laboratorio. Con ella, la palabra amiga adquiere un significado mucho más profundo. Por todos los consejos, tanto tuyos como de Joaquín, por toda tu ayuda, por ser mi paño de lágrimas, por tu sonrisa en el momento clave y por tantas otras cosas que no sé ni como reflejar. Tú eres uno de mis pilares fundamentales y sin ti esto no sería posible.

En la realización de esta tesis también han desempeñado un papel importante el resto de personas que componen los grupos de Manolo y Gloria, en especial a Ana, Fabi, José Angel, Celeste, Concha y Alicia, porque de todos ellos he aprendido mucho y

han dejado su huella. Gracias a Gloria, por su paciencia en la representación de la doble hélice de DNA y por todos su consejos.

Durante la realización de este trabajo he sido afortunada de poder participar en numerosas colaboraciones científicas sin las que esta tesis no sería la misma. Me gustaría agradecer a todos los investigadores con los que hemos colaborado su buena disponibilidad y su especial interés con este trabajo. Al grupo de Salvat, por creer en este trabajo y apostar por él, y en especial a Andrés, Teresa, Oscar y José, por ser un magnífico grupo no sólo a nivel laboral sino también a nivel humano.

A mis amigos de la carrera y de fuera de ella, por compartir conmigo tanto los buenos como los malos momentos. A Arantza y Tomás, por aquellas cervecitas en la cafetería de biológicas y que marcaron nuestros inicios. A Jesús, Elisa, Nico, Juanan, María y Alicia, porque ya nos sois mis amigos, sino mi familia madrileña. Y a las nuevas incorporaciones, Oscar, Susana, Alfredo y Sonia, que siempre se han interesado por cómo me iban las cosas y me han dado ánimos.

También quiero expresar mi agradecimiento a mi familia por todos los sacrificios y esfuerzos que han tenido que hacer para que esta tesis se convierta en realidad. A mis padres, por apoyarme en esta locura de venir a estudiar a Madrid, por enseñarme a valorar las cosas y por entender mis ausencias. Creo que no soy consciente de lo afortunada que soy.

A mi marido Amadeo, por compartirlo todo, por ser mi luz y por quererme tanto. Gracias por haberme apoyado siempre en todo, por haber creído en mí aún cuando yo no lo hacía y por estar ahí siempre que lo necesitaba. No encuentro palabras ni tengo papel suficiente para decirte todo lo que te agradezco, pero espero que tú ya lo sepas. Te quiero muchísimo. Esta tesis va por ti, por mi familia y por todos aquellos que aparecen mencionados.



## ÍNDICE



<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. LOS COMPUESTOS ANTIBACTERIANOS Y LA RESISTENCIA DE LAS BACTERIAS A ELLOS.....	1
1. 1. Descubrimiento y evolución de fármacos antibacterianos .....	1
1. 2. Mecanismos de acción de los compuestos antibacterianos .....	2
1. 3. Estrategias bacterianas para la supervivencia a los compuestos antibacterianos .....	8
1. 4. Nuevas vacunas como respuesta a la resistencia a compuestos antimicrobianos.....	10
1. 5. Nuevas aproximaciones para el desarrollo de compuestos antimicrobianos.....	11
2. LOS SISTEMAS DE DOS COMPONENTES.....	12
3. EL SISTEMA DE DOS COMPONENTES ESENCIAL.....	18
4. BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS EN BACTERIAS .....	21
4. 1. Biosíntesis y regulación de los ácidos grasos en <i>E. coli</i> .....	24
4. 2. Biosíntesis y regulación de los ácidos grasos en <i>B. subtilis</i> .....	26
4. 3. Biosíntesis y regulación de los ácidos grasos en <i>S. pneumoniae</i> .....	28
5. <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> .....	30
6. SISTEMAS DE EXPRESIÓN DE GENES ESENCIALES EN <i>S. PNEUMONIAE</i> .....	34
6. 1. Sistema de expresión regulado por tetraciclina.....	35
6. 2. Sistema de expresión regulado por nisina.....	37
6. 3. Sistema de expresión regulado por fucosa .....	38
6. 4. Sistema de expresión regulado por maltosa .....	39
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
<b>MATERIALES.....</b>	<b>49</b>
1. MATERIAL BIOLÓGICO: ESTIRPES BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS .....	49
1. 1. Estirpes bacterianas.....	49
1. 2. Plásmidos .....	49
2. MEDIOS DE CULTIVO.....	50
2. 1. Medio de cultivo para <i>S. pneumoniae</i> . .....	50
2. 2. Medio de cultivo para <i>E. coli</i> . .....	51
2. 3. Medio de cultivo par <i>L. lactis</i> . .....	51
3. FRAGMENTOS DE DNA Y OLIGONUCLEÓTIDOS .....	51
3. 1. Oligonucleótidos .....	51
3. 2. Fragmentos de DNA .....	52
4. ENZIMAS.....	53
5. TAMPONES Y SOLUCIONES.....	54
6. MATERIAL AUTORADIOGRÁFICO .....	55
7. SOPORTE INFORMÁTICO .....	56
<b>MÉTODOS .....</b>	<b>56</b>
1. MÉTODOS GENERALES .....	56
1. 1. Crecimiento y conservación de las estirpes bacterianas.....	56
1. 2. Preparación y transformación de células competentes.....	57
1. 3. Preparaciones de DNA.....	57
1. 4. Manipulación enzimática del DNA.....	59
1. 5. Elución y purificación de fragmentos de DNA.....	59
1. 6. Secuenciación del DNA .....	59

1. 7. Electroforesis de DNA .....	60
1. 8. Marcaje radiactivo del DNA .....	61
1. 9. Preparaciones de RNA .....	61
1. 10. Reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa .....	61
1. 11. Ensayo de extensión del cebador .....	62
1. 12. Preparación de los extractos de proteínas .....	62
1. 13. Preparación de vesículas de membrana.....	64
1. 14. Marcaje de proteínas <i>in vivo</i> .....	64
1. 15. Electroforesis de proteínas .....	65
1. 16. Ensayos de “Western-Blot” .....	66
1. 17. Microscopía de fluorescencia.....	67
1. 18. Medida de la actividad GFP .....	68
<b>2. MÉTODOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>68</b>
2. 1. Clonaje, hiperexpresión y sobreproducción del sistema de dos componentes YycFG en <i>S. pneumoniae</i> .....	68
2. 2. Clonaje, hiperexpresión e hiperproducción YycF en <i>E. coli</i> .....	70
2. 3. Purificación de YycF .....	74
2. 4. Ensayo de fosforilación de His <sub>6</sub> -YycF .....	80
2. 5. Análisis de las interacciones proteína-DNA .....	81
2. 6. Ensayo de autofosforilación de YycG.....	81
2. 7. Análisis por ultracentrifugación analítica de la proteína His <sub>6</sub> -YycF.....	82
2. 8. Síntesis <i>in vitro</i> de mRNA .....	83
2. 9. Marcaje fluorescente del RNA e hibridación de los microarrays.....	84
2. 10. Análisis de los datos de microarrays .....	85
2. 11. Extracción de los ácidos grasos de membrana .....	86
2. 12. Marcaje isotópico de los ácidos grasos de membrana.....	87
2. 13. Cromatografía en capa fina .....	87
2. 14. Análisis de polipéptidos por espectrometría de masas .....	88
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>89</b>
<b>CAPÍTULO 1: SISTEMA DE EXPRESIÓN INDUCIBLE EN <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>.....</b>	<b>89</b>
1. 1. Inducción de la expresión génica desde el promotor P <sub>M</sub> .....	89
1. 2. Análisis transcripcional del sistema de expresión en <i>S. pneumoniae</i> .....	93
1. 3. Análisis proteómico del sistema de expresión en <i>S. pneumoniae</i> .....	96
<b>CAPÍTULO 2: ANALISIS FUNCIONAL IN VIVO DEL SISTEMA DE DOS COMPONENTES ESENCIAL DE <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>.....</b>	<b>99</b>
2. 1. Hiperexpresión del regulador de respuesta <i>yycF</i> de <i>S. pneumoniae</i> .....	99
2. 2. Análisis transcripcional de <i>S. pneumoniae</i> después de la inducción del gen <i>yycF</i> .....	102
2. 3. Inducción de la transcripción del SDC cromosomal .....	105
2. 4. Análisis proteómico de <i>S. pneumoniae</i> después de la inducción del gen <i>yycF</i> .....	108
2. 5. Efecto de la inducción del gen <i>yycF</i> en la composición de ácidos grasos de membrana .....	112
2. 6. Hiperexpresión del regulador de respuesta <i>yycF</i> en la estirpe de <i>S. pneumoniae</i> deficiente en <i>yycG</i> y la hiperexpresión de los genes <i>yycFG</i> en <i>S. pneumoniae</i> .....	113
2. 7. Ensayo de autofosforilación de la histidina quinasa YycG en vesículas de membrana .....	115
2. 8. Análisis transcripcional de <i>S. pneumoniae</i> después de la inducción del gen <i>yycF</i> en la estirpe deficiente en <i>yycG</i> cromosómico y en la estirpe hiperexpresora de los genes <i>yycFG</i> .....	117
2. 9. Análisis proteómico de <i>S. pneumoniae</i> después de la inducción del gen <i>yycF</i> en la estirpe deficiente en <i>yycG</i> cromosómico y en la estirpe hiperexpresora de los genes <i>yycFG</i> .....	120
2. 10. Análisis de la composición de ácidos grasos de membrana por cromatografía en capa fina .....	124
<b>CAPÍTULO 3: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA YycF IN VITRO .....</b>	<b>126</b>
3. 1. Clonación e hiperexpresión del regulador de respuesta YycF en <i>E. coli</i> .....	126
3. 2. Ensayos de fosforilación de YycF.....	128
3. 3. Análisis por ultracentrifugación de la proteína YycF .....	131
3. 4. Detección y análisis, mediante ensayos de retardo en gel, de los complejos formados por la unión de la proteína YycF a un DNA específico .....	133
3. 5. Alteración de la síntesis <i>in vitro</i> de mRNA por YycF .....	135

<b>TABLAS SUPLEMENTARIAS.....</b>	<b>137</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>145</b>
1. Sistema de transporte y utilización de los maltosacáridos en <i>S. pneumoniae</i> .....	145
2. Hiperexpresión del SDC esencial de <i>S. pneumoniae</i> .....	152
3. Autorregulación del SDC esencial de <i>S. pneumoniae</i> .....	154
4. El SDC esencial de <i>S. pneumoniae</i> controla el metabolismo de la pared celular.....	158
5. El SDC esencial de <i>S. pneumoniae</i> regula la expresión de la biosíntesis de ácidos grasos.....	162
6. Posible modelo de regulación de YycF en las distintas dianas .....	165
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>169</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>173</b>
<b>PUBLICACIONES.....</b>	<b>191</b>



## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### FIGURAS

Figura 1. Esquema de estructuras bacterianas que incluye pared, membrana, ribosoma y ácidos nucleicos, conjuntamente con algunos ejemplos de antimicrobianos que actúan a esos niveles. ....	3
Figura 2. Estructura esquemática de un SDC bacteriano.....	13
Figura 3. Estructura tridimensional de la región citoplásmica de la HQ de <i>T. maritima</i> .....	15
Figura 4. Estructura molecular del regulador de respuesta DrrD de <i>T. maritima</i> .....	16
Figura 5. Estructura molecular del regulador de respuesta RegX3 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	17
Figura 6. Organización de los genes en los operones que codifican el SDC esencial YycFG, VicRK o MrtAB y estructura de las HKs homólogas a YycG .....	19
Figura 7. Biosíntesis de los ácidos grasos .....	23
Figura 8. Biosíntesis de los ácidos grasos en <i>E. coli</i> .....	25
Figura 9. Biosíntesis de los ácidos grasos en <i>B.subtilis</i> .....	27
Figura 10. Biosíntesis de los ácidos grasos en <i>S. pneumoniae</i> .....	29
Figura 11. Secuencia de la región intergénica <i>tetR-tetA</i> del <i>Tn10</i> en <i>E. coli</i> .....	36
Figura 12. Organización genética del operón de la biosíntesis de nisina en <i>L. lactis</i> .....	37
Figura 13. Organización genética del operón de la fucosa y representación de su promotor ( $P_{fcsK}$ ) de <i>S. pneumoniae</i> .....	38
Figura 14. Organización del regulón de la maltosa de <i>S. pneumoniae</i> .....	39
Figura 15. Región promotora de los operones <i>malXCD</i> y <i>malMP</i> .....	40
Figura 16. Diagrama de la región del gen <i>gfp</i> en el plásmido pGreenTIR .....	42
Figura 17. Mapa físico de los plásmido pLS1RGFP y pLS1GFP .....	43
Figura 18. Análisis de la producción de His <sub>6</sub> -YycF generado por cultivos de <i>E. coli</i> M15 [pREP4] [pQ30RR] inducidos a 37 °C .....	70
Figura 19. Análisis de la producción de His <sub>6</sub> -YycF generado por cultivos de <i>E. coli</i> M15 [pREP4] [pQ30RR] inducidos a 37 °C mediante western blot .....	71
Figura 20. Análisis de la producción de His <sub>6</sub> -YycF generado por cultivos de <i>E. coli</i> M15 [pREP4] [pQ30RR] inducidos a 30 °C .....	72
Figura 21. Análisis de la producción de C-lytA-YycF por <i>E. coli</i> REG-1[pALEXRR].....	74
Figura 22. Análisis de la purificación de la proteína recombinante His <sub>6</sub> -YycF.....	76
Figura 23. Mapa físico del plásmido pLS1RGFP.....	90

Figura 24. Análisis de la curva de crecimiento y detección de fluorescencia de la estirpe JNR7/87[pLS1RGFP].....	91
Figura 25. Detección de la proteína GFP en la estirpe JNR7/87[pLS1RGFP] .....	93
Figura 26. Representación de las categorías funcionales afectadas tanto en la inducción continuada como en la inducción transitoria por el sistema de los maltosacáridos.....	94
Figura 27. Alineamiento de los operadores O1 y O2 de MalR con secuencias localizadas en las regiones promotoras de genes implicados en el metabolismo y transporte de los maltosacáridos.....	95
Figura 28. Análisis proteómico de la inducción de la estirpe de <i>S. pneumoniae</i> JNR7/87[pLS1RGFP]....	96
Figura 29. Análisis de la curva de crecimiento y detección de fluorescencia de la estirpe JNR7/87[pLS1RGFP].....	100
Figura 30. Detección de la expresión de GFP y DNA teñido por microscopía de fluorescencia .....	101
Figura 31. Biosíntesis de los ácidos grasos en <i>S. pneumoniae</i> .....	103
Figura 32. Secuencia de la región 5' del operón <i>yycFG</i> y determinación del punto de inicio de la transcripción .....	106
Figura 33. Análisis por RT-PCR semicuantitativa de los genes <i>yycF</i> , <i>yycG</i> y <i>vicX</i> .....	107
Figura 34. Análisis proteómico de inducción continuada de las estirpes JNR7/87[pLS1RGFP] y JNR7/87[pRR] .....	109
Figura 35. Nivel de expresión relativo de las proteínas GFP y YycF en la estirpe de <i>S. pneumoniae</i> JNR7/87[pRR] después de inducciones transitorias durante 5 y 30 min o de una inducción continuada.....	111
Figura 36. Microscopía de contraste de fase de las estirpes de <i>S. pneumoniae</i> .....	115
Figura 37. Ensayo de actividad de autofosforilación y detección de la proteína YycF de las estirpes de <i>S. pneumoniae</i> .....	116
Figura 38. Análisis proteómico de inducción continuada de las estirpes JNR7/87[pLS1RGFP], JNR7/87( <i>yycG::kan</i> )[pRR] y JNR7/87[pRRHK].....	122
Figura 39. Detección de la proteína YycF en las estirpes JNR7/87[pRRHK] y JNR7/87( <i>yycG::kan</i> )[pRR] .....	123
Figura 40. Análisis por cromatografía en capa fina de los ácidos grasos sintetizados por las diferentes estirpes de <i>S. pneumoniae</i> .....	124
Figura 41. Sobreproducción y purificación de YycF.....	127
Figura 42. Fosforilación <i>in vitro</i> de la proteína YycF utilizando acetil fosfato como donador .....	129
Figura 43. Fosforilación <i>in vitro</i> de la proteína YycF procedente de la fracción soluble o insoluble .....	129
Figura 44. Análisis de diferentes proporciones de fosforilación de la proteína YycF .....	130
Figura 45. Análisis por MALDI-TOF de la proteína fosforilada y sin fosforilar .....	131



Figura 46. Perfil de ultracentrifugación analítica de YycF procedente de la fracción de proteína soluble .....	132
Figura 47. Interacción de la región promotora de FabT con la proteína YycF .....	134
Figura 48. Transcripción <i>in vitro</i> de los promotores P <sub>fabT</sub> y P <sub>x</sub> .....	135
Figura 49. Metabolismo de la maltosa y su interrelación con otras rutas metabólicas en <i>S. pneumoniae</i> .....	146
Figura 50. Mecanismo de transporte y metabolismo de la sacarosa en <i>S. pneumoniae</i> .....	151
Figura 51. Detección de YycF en preparaciones de membranas linearizadas .....	154
Figura 53. Análisis de interacción de YycF y la región promotora de SDC YycFG .....	156
Figura 54. Interacción de la región promotora de PcsB con la proteína YycF .....	159
Figura 55. Biosíntesis de ácidos grasos en <i>S. pneumoniae</i> .....	164
Figura 56. Posible modelo de regulación de YycF en las distintas dianas .....	167

## TABLAS

Tabla 1. Estirpes bacterianas .....	49
Tabla 2. Plásmidos .....	49
Tabla 3. Oligonucleótidos .....	52
Tabla 4. Fragmentos de DNA .....	52
Tabla 5. Soluciones y tampones utilizados .....	54
Tabla 6. Proteínas afectadas por la inducción con maltosa, detectadas por análisis proteómico .....	97
Tabla 7. Proteínas afectadas por la inducción del gen <i>ycyF</i> , detectadas por análisis proteómico .....	110
Tabla 8. Composición de ácidos grasos en extractos totales de lípidos de membrana de las estirpes JNR7/87[pLS1RGFP] y JNR7/87[pRR] .....	112
Tabla 9. Genes con patrón de expresión diferente entre las estirpes JNR7/87( <i>ycyG::kan</i> )[pRR] y JNR7/87[pRRHK] .....	119
Tabla 10. Proteínas afectadas por la inducción del gen <i>ycyF</i> en una estirpe deficiente en el gen <i>ycyG</i> o por la inducción de los genes <i>ycyFG</i> , detectadas por análisis proteómico .....	121
Tabla S1. Genes afectados por el sistema de inducción y detectados por análisis genómico, durante la inducción transitoria o continuada .....	137
Tabla S2. Genes afectados por la inducción transitoria durante 5 min del gen <i>ycyF</i> detectadas por análisis genómico .....	140
Tabla S3. Genes afectados por la inducción continuada del gen <i>ycyF</i> , detectadas por análisis genómico .....	141

Tabla S4. Genes con patrón de expresión alterado en las estirpes JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] y JNR7/87[pRRHK] con respecto a la estirpe control JNR7/87[pLS1RGFP]..... 143

Tabla S5. Proteínas afectadas por la inducción del gen *yycF* en una estirpe deficiente en el gen *yycG* o por la inducción de los genes *yycFG*, detectadas por análisis proteómico ..... 144



## Lista de abreviaturas

Amp	ampicilina
AGI	ácido graso insaturado
AGS	ácido graso saturado
ATP	adenosina 5'-trifosfato
BAG	Biosíntesis de los ácidos grasos
BrEt	Bromuro de Etidio
BSA	seroalbumina bovina
cDNA	DNA codificante
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
cm	centímetros
cpm	cuentas por minuto
CTP	Citidina 5'-trifosfato
Ci	curios
Da	dalton
DAPI	4', 6'-diamidino-2-fenilindol
dATP	desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	desoxiguanosina 5'-trifosfato
dNTP	desoxinucleótido 5'-trifosfato
DOC	deoxicolato
DTT	ditiotreitól
dTTP	desoxitimidina 5'-trifosfato
EDTA	N,N,N',N'-etilendiamino etraacetato disódico
Em	eritromicina
g	fuerza g
GFP	proteína fluorescente verde
GTP	guanosina 5'-trifosfato
h	horas
HEPES	ácido N-2-hidroxietilpiperacín-N-N'-2-etanosulfónico
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HQ	histidina quinasa
IPG	gradiente de pH inmovilizado
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
kb	kilobases
Kan	Kanamicina
L	litros

M	molar
MALDI-TOF	desorción/ionización láser asistida por matriz
mg	miligramos
min	minutos
mRNA	RNA mensajero
nm	nanómetros
nt	nucleótidos
OD	densidad óptica
Oligo	oligo-desoxirribonucleótido
ORF	marco de lectura abierto (Open Reading Frame)
P	fosfato
PAA	poliacrilamida
Pb	par de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEI	polietilenimina
rpm	revoluciones por minuto
RR	regulador de respuesta
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SDC	sistema de dos componentes
SDS	dodecil sulfato sódico
seg	segundos
Tris	trihidroximetil-amino-metano
U	unidades
UTP	uridina 5'-trifosfato
UV	ultravioleta
V	voltios
v/v	volumen/volumen
YycF	proteína YycF sin fosforilar
YycF-P	proteína YycF fosforilada



## **INTRODUCCIÓN**





## **1. LOS COMPUESTOS ANTIBACTERIANOS Y LA RESISTENCIA DE LAS BACTERIAS A ELLOS**

Los compuestos antibacterianos son productos naturales, semi-sintéticos (naturales modificados posteriormente *in vitro*) o sintéticos, que inhiben el crecimiento o producen la muerte celular a bajas concentraciones. Su utilización a lo largo de los años ha reducido la mortalidad debida a las enfermedades infecciosas, pero no la prevalencia de las mismas, ya que tanto su uso como su abuso, han hecho que las bacterias hayan evolucionado desarrollando mecanismos de resistencia que impiden la actuación de estos fármacos. Actualmente la mayoría de ellos son denominados genéricamente antibióticos, aunque en realidad este nombre fue inicialmente utilizado sólo para designar a los compuestos con actividad antimicrobiana sintetizados por un organismo.

### **1. 1. Descubrimiento y evolución de fármacos antibacterianos**

Las sulfamidas, derivadas de la sulfanilamida, fueron los primeros agentes antibacterianos eficaces empleados en el tratamiento de las infecciones en el hombre. Su descubrimiento durante la década de 1930 a 1940 fue el punto de partida de la terapia antiinfecciosa. Estos fármacos sintéticos poseían actividad frente a una gama limitada de cepas bacterianas tanto gram positivas como gram negativas, y generalmente se usaban sólo para el tratamiento de infecciones severas debido a su alta toxicidad. La introducción de los antibióticos en el tratamiento clínico fue propiciada por el aislamiento de la penicilina G en 1940 a partir de cultivos del hongo *Penicillium notatum* y su posterior síntesis empleando la estirpe sobreproductora *P. chrysogenum*. La utilización de la penicilina G permitió comprobar rápidamente que este producto natural poseía propiedades superiores a las de las sulfamidas y este hecho condujo a la búsqueda de otros antibióticos de procedencia natural. Durante el periodo de 1950 a 1960 se descubrieron y fueron comercializadas muchas nuevas clases de antibióticos, incluyendo las cefalosporinas, las tetraciclinas, y los macrólidos como la eritromicina. En el año 1958 se aisló el núcleo de la penicilina, el ácido 6-aminopenicilánico, que fue la materia prima clave para fabricar una gama amplia de penicilinas semi-sintéticas. Este hecho permitió demostrar claramente que, a través de la modificación química, se

pueden mejorar las propiedades antibacterianas y farmacocinéticas de los antibióticos. Esta estrategia se aplicó rápidamente a la familia emparentada de las cefalosporinas, y posteriormente a otras clases de antibióticos. Durante el intervalo desde 1960 hasta 1970 los antibióticos semi-sintéticos suplantaron la primera generación de productos naturales; muchos de ellos cayeron en desuso o bien se reservaron para aplicaciones específicas. Durante la década de los 80 se produjo la introducción en el mercado de las quinolonas sintéticas y de los agentes  $\beta$ -lactámicos totalmente sintéticos. También en este periodo se describieron dos nuevas clases de antibióticos, la daptomicina, un antibiótico lipopéptido cíclico obtenido de cultivos de *Streptomyces roseosporus* (Weis et al., 2008), y el linzolido, un compuesto sintético perteneciente a la familia de las oxazolidinonas (Brickner et al., 2008). A pesar de que ambas drogas fueron descritas en los años 80, no fue hasta los años 2003 y 2000, respectivamente, cuando se permitió su administración. Ambos antibacterianos son efectivos en la terapia de infecciones causadas por estirpes gram positivas resistentes a meticilina y/o vancomicina (Pucci, 2006; Wright, 2007).

Así, durante el periodo comprendido entre 1960 y 1985 hubo una expansión enorme en el mercado mundial de los antibióticos. Durante esta Edad de Oro se creía generalmente que los productos naturales eran una fuente sin límite para el descubrimiento de agentes antibacterianos nuevos. No obstante, al comienzo de la década de los 90 comenzó a constatarse que dicha suposición no era cierta, ya que se hacía mas y mas difícil, y por tanto mas y mas costoso, encontrar nuevas clases de compuestos antibacterianos y consecuentemente en los últimos 20 años, el número de nuevos antibióticos que han aparecido en el mercado es escaso (Spellberg et al., 2004; Coates y Hu, 2006).

## **1. 2. Mecanismos de acción de los compuestos antibacterianos**

Para que un agente antimicrobiano ejerza su acción, es necesario que llegue al foco infeccioso, penetre en las bacterias y alcance intracelularmente la concentración necesaria. La entrada en la bacteria se puede lograr por difusión o transporte activo (Barza, 1993). Una vez dentro del microorganismo, la actividad del antibiótico puede ser bacteriostática, cuando provoca una inhibición de la multiplicación del

microorganismo de forma reversible, o bactericida, cuando tiene un efecto letal sobre el microorganismo.

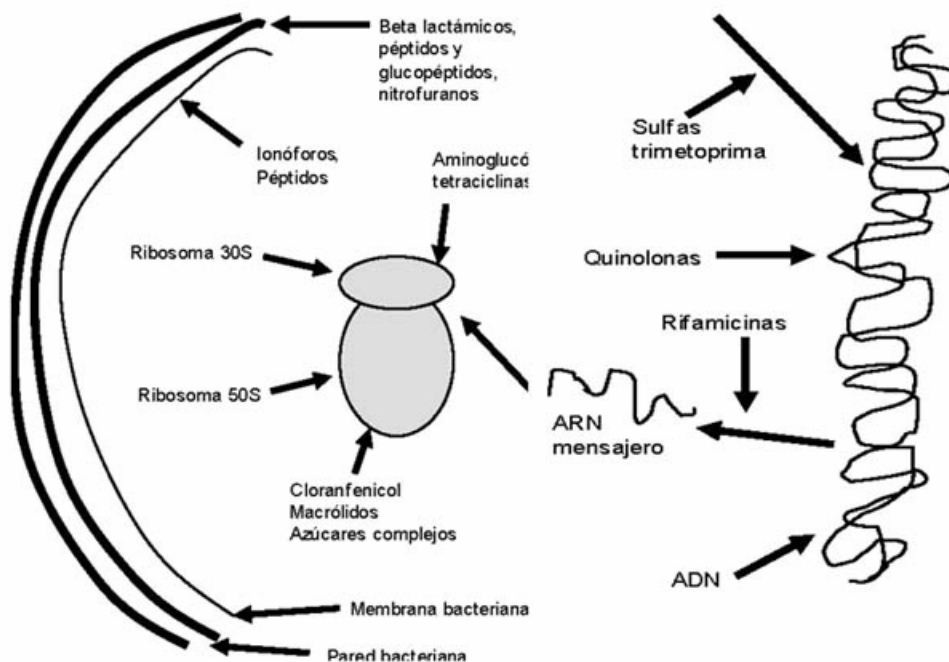


Figura 1. Esquema de estructuras bacterianas que incluye pared, membrana, ribosoma y ácidos nucleicos, conjuntamente con algunos ejemplos de antimicrobianos que actúan a esos niveles.

Los antibióticos actúan sobre dianas bacterianas incluidas en un número limitado de procesos biológicos: (i) biosíntesis de la pared celular (Kishii et al., 2007), (ii) síntesis de proteínas, (iii) síntesis de los ácidos nucleicos y (iv) síntesis y alteración de la membrana citoplásmica (Fig. 1).

**- La inhibición de la biosíntesis de la pared celular bacteriana.** Los antibióticos que ejercen su acción antibacteriana inhibiendo la correcta síntesis de la pared celular son agentes bactericidas, ya que esta alteración deriva en lisis celular. La pared celular no existe en las células de los mamíferos, por lo que generalmente se producen pocos efectos secundarios en el huésped cuando se utilizan drogas que tienen esta estructura como blanco farmacológico.

La pared bacteriana está compuesta por una red de péptidos glucanos unidos por enlaces covalentes y debe destacarse que esta envoltura celular posee diferencias en las bacterias gram positivas y gram negativas. Ambos tipos de bacterias poseen una

membrana celular recubierta por una capa de peptidoglicano, pero esta capa es mucho más gruesa en las bacterias gram positivas que en las gram negativas. Sin embargo, puede considerarse que la envoltura de estas últimas es considerablemente más compleja, pues presenta una membrana adicional (la membrana externa), que recubre a la capa de peptidoglicano.

El peptidoglicano es un heteropolímero formado por dos derivados de azúcares N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico, y un pequeño grupo de aminoácidos que incluyen L-alanina, D-alanina, D-glutámico, y lisina o en otros casos ácido diaminopimélico (DAP). Estos componentes se unen entre sí para formar una estructura que se repite a lo largo de la pared. La estructura básica del peptidoglicano está constituida por una fina lámina en la que las cadenas de azúcares se conectan entre sí por puentes formados por aminoácidos. Los enlaces glucosídicos que unen los azúcares en las cadenas de glucano son muy fuertes, pero estas cadenas por sí solas no son capaces de conferir rigidez en todas las direcciones, de ahí que sólo cuando se entrecruzan a través de puentes peptídicos se logra la rigidez característica de la pared. El número de puentes peptídicos que se forman no es igual en todas las bacterias y es característico de cada tipo, siendo precisamente las paredes más rígidas aquellas con mayor número de puentes intercatenarios. En las bacterias gram negativas los puentes se establecen por lo general mediante enlaces peptídicos directos del grupo amino del diaminopimélico y el grupo carboxilo de la D-alanina terminal. En bacterias gram positivas habitualmente se establece mediante el enlace de varios aminoácidos cuyo número y tipo dependen de los diferentes organismos. En la formación de estos puentes peptídicos están involucradas las enzimas carboxipeptidasas y las transpeptidasas (más conocidas como PBP de “Penicilin Binding Protein”), que se encuentran ubicadas en la membrana citoplasmática con su sitio activo hacia el espacio periplásmico. Las principales PBP denominadas en general PBP I, II y III, tienen en sus extremos carboxilo (C) y amino (N) terminales, respectivamente, los dominios de actividad transpeptidasa y transglicosidasa. Estas enzimas bifuncionales son el blanco de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (por ejem. las penicilinas y las cefalosporinas), que actúan como pseudosustratos y acilan el sitio activo de las transpeptidasas (Macheboeuf et al., 2006), logrando una inhibición enzimática irreversible. Esta inhibición de las transpeptidasas impide la formación de los puentes peptídicos y como consecuencia, la pared resultante es demasiado débil para impedir la lisis osmótica de la célula bacteriana.

Además de los  $\beta$ -lactámicos, los glicopéptidos (cuyo prototipo es la vancomicina) también actúan frente a la capa de peptidoglicano de la pared celular. En este caso, en lugar de actuar a nivel de las enzimas implicadas en el entrecruzamiento del peptidoglicano, la vancomicina se une al péptido, impidiendo así reaccionar a éste, con las transpeptidasas o transglicosidasas (Appelbaum y Bozdogan, 2004). El efecto final es el mismo, en ambos casos el antibiótico impide la unión de las cadenas del peptidoglicano, lo que conduce a una pared más débil que predispone la muerte de la bacteria por lisis de la pared celular. Como los glicopéptidos y los  $\beta$ -lactámicos actúan sobre dianas diferentes (la enzima o su sustrato) pueden actuar sinérgicamente cuando se combinan.

**- La inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas.** Una gran variedad de antibióticos naturales, semi-sintéticos o sintéticos inhiben la proliferación de bacterias patógenas interfiriendo en la síntesis proteica o uniéndose a sus ribosomas. Aunque los mecanismos de síntesis de proteínas en procariotas y eucariotas son básicamente parecidos, existen diferencias suficientes para que se hayan podido desarrollar antibióticos que actúen específicamente contra el proceso de traducción bacteriana.

Entre estos inhibidores se incluyen importantes antibióticos como los poliketidos incluyendo los macrólidos (por ejem. las eritromicinas y las tetraciclinas), otros compuestos (por ejem. la mupiricina) y los aminoglucósidos (la estreptomicina fue el miembro fundador de esta familia y actualmente se utilizan variantes naturales como la kanamicina). Dado el gran número de procesos que están implicados en la iniciación, elongación y terminación del ensamblaje de las proteínas por los ribosomas, no es sorprendente que existan muchos pasos que puedan ser bloqueados por compuestos inhibidores de la síntesis proteica (Tenson y Mankin, 2006). La mayoría de los sitios de acción de estos antibacterianos coinciden con los centros funcionales del ribosoma. Así, en la subunidad pequeña del ribosoma se unen al centro A o centro aceptor de nuevos aminoacil-tRNAs, donde se sitúa primero el aminoacil-tRNA en la subunidad 30S, y al centro P o centro peptidil-transferasa, impidiendo la translocación del peptidil-tRNA del locus A al locus P. Otras dianas de los antibióticos son el túnel de salida del péptido naciente y el factor de elongación en la subunidad 50S.

Los aminoglicósidos son un grupo de agentes antibacterianos (por ejem. estreptomicina) derivados de productos naturales. Estos compuestos actúan uniéndose

específicamente y de forma irreversible a un receptor proteico de la subunidad 30S de los ribosomas (en el caso de la estreptomicina, la proteína P10). Esta unión causa, por un lado, el bloqueo de la actividad normal del complejo de iniciación, con lo que se detiene la síntesis protéica, y por otro, distorsiona el codón del centro A, provocando la incorporación de un aminoácido distinto al codificado. De esta manera, se producen errores de lectura y se sintetizan proteínas anómalas (Gromadski y Rodnina, 2004; Jana y Deb, 2006).

Otros antibióticos que actúan a nivel de la subunidad 30S son las tetraciclinas, que provocan una inhibición de la síntesis proteica bloqueando la fijación del aminoacil-tRNA al locus A e inhibiendo el transporte de aminoácidos hasta la subunidad 50S (Taylor y Chau, 1996).

A nivel de la subunidad 50S actúan los macrólidos, que se unen al segmento superior del péptido naciente cerrando el túnel (Wilson et al., 2005). Otro de los antibióticos que afecta a esta subunidad es la familia del cloranfenicol. Este antibiótico bloquea la actividad de la enzima peptidil transferasa al unirse a la subunidad 50S evitando la inhibición del enlace peptídico (Lovett, 1996). Los macrólidos, como la eritromicina, y los lincosamínidos, como la clindamicina, actúan ambos al mismo nivel, impidiendo la translocación, es decir, el paso del peptidil-tRNA del locus A al locus P (Roberts, 2008).

La multiplicidad de los pasos moleculares implicados en la síntesis de proteínas ha permitido el desarrollo de nuevos antibióticos, entre los que se encuentran las oxazolidinonas, cuyo desarrollo se inició en 1987, pero no fue hasta 1990 cuando se empezó a comercializar. Las oxolidinonas se unen a la subunidad 50S, en un lugar distinto al del cloranfenicol y las lincosaminas, y actúan inhibiendo a la enzima peptidil transferasa (Lin et al., 1997; Matassova et al., 1999). Además, también se utiliza actualmente la mupiricina, polikétido no macrólido, que inhibe específicamente a la enzima Ile-tRNA sintetasa (Kim et al., 2003).

**- La inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.** Una gran variedad de antibióticos naturales, semi-sintéticos o sintéticos inhiben los procesos de replicación y reparación del DNA, así como el proceso de transcripción. Las topoisomerasas son proteínas de unión a DNA que controlan la topología del DNA bacteriano al mantener el superenrollamiento, influyendo así en los procesos de su síntesis y en su transcripción para sintetizar RNA (Champoux, 2001). Todas las topoisomerasas catalizan la hidrólisis

de enlaces fosofodiester del DNA, formando una unión covalente entre el extremo 3' de la cadena cortada y una tirosina de la proteína. Esta incisión permite liberar la tensión topológica acumulada. La acción de la topoisomerasa es reversible, ya que una vez eliminada la tensión topológica, los dos extremos de la hebra cortada vuelven a unirse. Las enzimas que cortan una sola hebra del DNA están clasificadas como tipo I, mientras que las que cortan ambas hebras del DNA y generan una rotura en la doble hélice están clasificadas como tipo II. La DNA girasa y la topoisomerasa IV son ambas topoisomerasas de tipo II y son proteínas esenciales en el ciclo vital bacteriano. La DNA girasa cataliza el superenrollamiento negativo del DNA procariótico, utilizando la energía libre liberada por la hidrólisis del ATP. Así la DNA girasa introduce superenrollamientos en la doble hélice dando lugar a la estructura tridimensional altamente condensada del DNA. Tanto la DNA girasa como la topoisomerasa IV son proteínas tetraméricas constituidas por dos subunidades. La DNA girasa está constituida por las subunidades GyrA y GyrB y la topoisomerasa IV está compuesta de las subunidades ParC y ParE (Huang, 1996). La proteína ParE es homóloga a la subunidad GyrB. Estas enzimas, dependiendo del tipo de bacteria, representan la diana principal o secundaria de la acción antimicrobiana de las quinolonas (Mitscher, 2005). La DNA girasa es la diana principal de las quinolonas en las bacterias gram negativas, mientras que la topoisomerasa IV parece ser la diana principal de muchas quinolonas en las bacterias gram positivas, como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* (Jacoby, 2005).

El proceso de la transcripción del DNA para sintetizar el RNA es catalizado en todos los organismos por la RNA polimerasa. Sin embargo, la enzima bacteriana constituida por las subunidades  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  y  $\sigma$  muestra diferencias significativas con su homónima humana. Este hecho permitió el desarrollo de las rifampicinas, cuya diana es la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa bacteriana, aunque actualmente sólo es utilizada para combatir infecciones de tuberculosis debido a su toxicidad (Lal y Lal, 1994).

**- La alteración de la membrana citoplásmica.** Las células con la membrana dañada mueren invariablemente por insuficiencia metabólica o lisis, incluso cuando no están en crecimiento, debido a que esta estructura es vital para todas las células, ya que entre sus propiedades se encuentra la de actuar como barrera de permeabilidad selectiva (Lambert, 2002). Los compuestos que alteran esta estructura modifican la

permeabilidad, permiten la salida de iones de potasio y macromoléculas como los ácidos nucleicos al espacio extracelular y tienen un efecto lítico. Sin embargo, debido a la presencia universal de membranas en todas las células, tanto en las procarióticas como en las eucariotas, la mayor parte de los antibacterianos que actúan a este nivel son tóxicos para los humanos. Los antibióticos que alteran la membrana citoplásmica en bacterias gram negativas son las polimixinas, que interaccionan con los fosfolípidos de las membranas desorganizándolos y aumentando su permeabilidad, lo que provoca una pérdida de metabolitos esenciales y la muerte de la bacteria (Landman et al., 2008).

En las bacterias gram positivas, uno de los compuestos antimicrobianos que actúan a este nivel es la daptomicina (Weis et al., 2008). Este antibacteriano es el prototipo de una nueva familia de antibióticos, hoy en día conocida como lipopéptidos cíclicos y que actúa insertándose directamente dentro de la membrana citoplasmática de las bacterias gram positivas, tanto aerobias como anaerobias, a través de un proceso dependiente de la concentración de calcio. Como consecuencia de ello, se produce una rápida despolarización de la membrana bacteriana y la salida al exterior celular de una corriente de iones de potasio. Estos cambios determinan una rápida detención de los procesos de síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos (DNA y RNA), lo que provoca la muerte bacteriana.

### **1. 3. Estrategias bacterianas para la supervivencia a los compuestos antibacterianos**

Una vez que se ha comprobado la efectividad de un antibiótico y comienza a utilizarse en terapia humana, sus días están contados. La resistencia a dicho compuesto aparece en un periodo de meses a años (Davies, 1996). Para la penicilina, la resistencia empezó a detectarse en los dos años posteriores a su introducción en 1940, siendo el típico mecanismo de resistencia que implica la acción de un producto génico y que se distribuye y perpetúa rápidamente a las poblaciones bacterianas.

Existen varios mecanismos que emplean las bacterias para lograr ser resistentes a los antibacterianos. Los mecanismos más significativos son: (i) mutación en la diana de la droga, (ii) superproducción de esa diana, (iii) modificación de la permeabilidad celular mediante pérdida o mutaciones de los poros, (iv) aumento de la expresión de las bombas implicadas en la exportación de los compuestos antimicrobianos e (v)



inactivación de los medicamentos por degradación enzimática (Nikaido, 2001; Poole, 2007; Zapun et al., 2008).

Para los agentes antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos, los cambios en la permeabilidad celular y las bombas de expulsión contribuyen a reducir el nivel del fármaco que alcanza su diana. La mutación de las PBPs contribuye a disminuir su afinidad por este tipo de antibacterianos (Morlot et al., 2005; Zapun et al., 2008). Sin embargo, el mecanismo más utilizado para la resistencia a los  $\beta$ -lactámicos es la degradación del antibiótico por la sobreexpresión de una de las cuatro clases de enzimas  $\beta$ -lactamasas (Babic et al., 2006; Rossolini y Docquier, 2006). Estas enzimas producidas por las bacterias hidrolizan el anillo lactámico antes de que pueda unirse a las PBPs de la membrana citoplásmica, desactivando este agente antimicrobiano (Hrabak, 2007).

El mecanismo más utilizado por las bacterias resistentes a aminoglicósidos es la expresión de enzimas (acetilasas, adenilasas y fosfatasas) capaces de modificar los grupos sustituyentes de la molécula antibiótica, lo que resulta en un compuesto de baja afinidad por la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, que no inhibe la síntesis de las proteínas (Shakil et al., 2008).

En bacterias gram positivas y gram negativas, que son resistentes a tetraciclinas, se produce una proteína de membrana que actúa como un exportador o bomba de expulsión de la droga (Poole, 2005), lo que permite mantener la concentración del antibiótico, dentro de la bacteria, por debajo de los niveles efectivos. Además, este mecanismo puede conferir a las bacterias multi-resistencia (resistencia a varios agentes antimicrobianos), cuando ellas producen una proteína capaz de exportar activamente compuestos no relacionados estructuralmente (Langton et al., 2005). Así, la secreción de los agentes antimicrobianos impide que estos alcancen una concentración intracelular elevada y como consecuencia actúen sobre su diana.

La consecuencia de todo lo antedicho es que muchas de las bacterias patógenas han desarrollado mecanismos de resistencia a los antibióticos y por ello la utilización de éstos hace que dichas bacterias se seleccionen rápidamente. Muchas veces, los genes de resistencia están localizados en plásmidos conjugativos y de amplio espectro de huésped, y este hecho facilita la transferencia de la resistencia entre distintos géneros (por ejem. de *Escherichia coli* a especies de los géneros *Salmonella* o *Pseudomonas*). Otro problema añadido es la existencia de plásmidos de multi-resistencia que son portadores de genes que confieren resistencia a más de una clase de antibióticos. Para

intentar resolver el problema de incremento de las resistencias, durante los últimos 50 años se han desarrollado análogos de los agentes antimicrobianos naturales. Sin embargo, el número de modificaciones químicas que se pueden realizar en dichos compuestos, tales como la penicilina, son finitas, por este motivo es más difícil obtener nuevos análogos clínicamente significativos activos contra las bacterias resistentes. Además, otra estrategia que se ha utilizado, es el uso del antibiótico combinado con otro compuesto que potencia directa o indirectamente su acción. Un ejemplo clásico es el augmantine medicamento compuesto de la amoxicilina, que es una penicilina muy activa pero muy sensible a  $\beta$ -lactamasas bacterianas y del ácido clavulánico, que es un antibiótico poco potente pero que inhibe las  $\beta$ -lactamasas (Rolinson, 1982).

A pesar de todos los avances en las terapias de infecciones bacterianas, en la actualidad, la frecuencia de aparición de bacterias resistentes continúa en aumento, entre ellas estirpes de *S. aureus* resistentes a meticilina (Reynolds et al., 2004), de *S. pneumoniae* resistente a penicilinas (Karchmer, 2004), y de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a todas las  $\beta$ -lactamasas y las quinolonas (Paterson, 2006). Este hecho indica que en la actualidad es mayor la pérdida de resistencia a agentes antiinfectivos que la aparición de nuevos agentes antibacterianos (Hancock, 2007).

#### **1. 4. Nuevas vacunas como respuesta a la resistencia a compuestos antimicrobianos**

Las vacunas son la respuesta ideal al desafío de enfermedades infecciosas, que actuando a nivel de prevención y, en contraste con los compuestos antimicrobianos, raramente contribuyen a la aparición de resistencias. Una de las vacunas que se ha desarrollado recientemente es la vacuna conjugada heptavalente contra *S. pneumoniae*. Esta vacuna contiene los polisacáridos capsulares de los serotipos neumocócicos, que están con más frecuencia implicados en infecciones pediátricas (Pletz et al., 2008). Sin embargo, la elevada frecuencia de transferencia genética entre estirpes de *S. pneumoniae* hace predecir que en breve periodo de tiempo, se producirá una variación en los serotipos prevalentes, lo que previsiblemente provocará que estas vacunas sean ineficientes. Por otra parte, vacunas contra *S. aureus* resistentes a meticilina han mostrado ser inefectivas en pacientes con tratamiento de diálisis renales, que son en particular propensos a bacteremias provocadas por estas bacterias (Fattom et al., 2004).

En la actualidad, se está investigando el posible desarrollo de las vacunas profilácticas contra infecciones urológicas por *Escherichia coli* (Song y Abraham, 2008), pero ninguna se encuentra en la fase próxima a su comercialización. Las vacunas contra bacterias oportunistas nosocomiales gram negativas son improbables debido a la diversidad de especies implicadas.

En los casos en los que la vacunación no es posible o es poco realista, los agentes antimicrobianos son el pilar de la defensa, por ello en la actualidad continúa el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos.

## **1. 5. Nuevas aproximaciones para el desarrollo de compuestos antimicrobianos**

El conocimiento de la fisiología y genética bacteriana fue extremadamente limitado durante los años 1940 a 1960, periodo durante el cual los progenitores de todos los antibióticos utilizados actualmente en clínica, se identificaban con un sencillo test de inhibición del crecimiento bacteriano y posteriormente se caracterizaba su mecanismo de acción (Labischinski, 2001). Sin embargo, la llegada de la era genómica, que tuvo lugar en el año 1995 cuando se finalizó la secuenciación del primer genoma procariota completo (Fleischmann et al., 1995) y se realizó la posterior determinación de la secuencia del genoma de numerosas bacterias (McDevitt y Rosenberg, 2001; Freiberg y Brotz-Oesterhelt, 2005) permitió predecir por homología la función de muchos productos génicos bacterianos. Esta información, junto con el conocimiento de la función de los procesos biológicos, se utiliza en la actualidad para seleccionar las dianas potenciales que deben ser validadas funcionalmente para la creación nuevos agentes antibacterianos (Arcus et al., 2006). La diana molecular debe poseer varias características, siendo la principal su inexistencia en el anfitrión humano, o bien, al menos mostrar diferencias significativas con su homólogo humano. Además, debe estar presente en aquella bacteria que causa la enfermedad para la cual es necesaria una curación, y su inhibición o inactivación debe conducir a la muerte de la bacteria, es decir la diana debe ser esencial para la supervivencia bacteriana.

Una clase de dianas potencial para las cual todavía no se han desarrollado compuestos antimicrobiano y que cumple estos requisitos, ya que controlan procesos

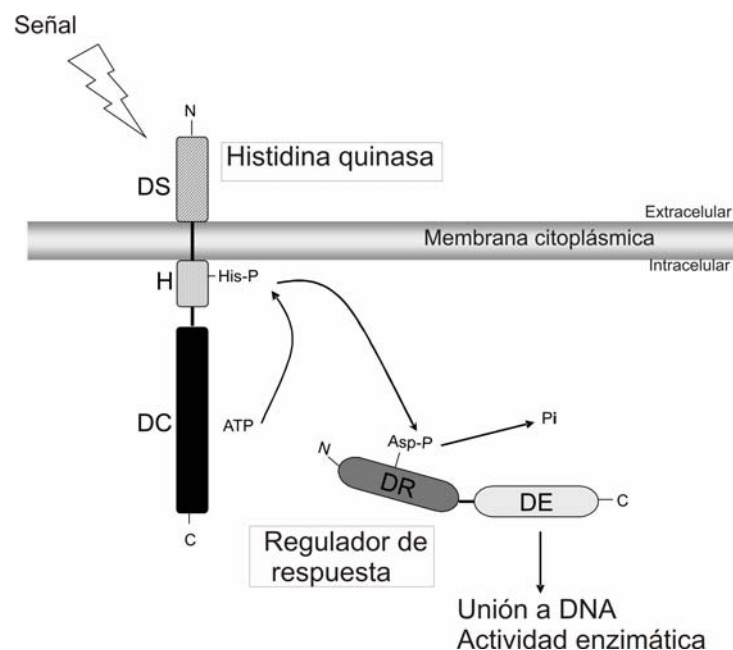
esenciales y no se encuentran en eucariotas, son los sistemas de dos componentes (SDC).

## 2. LOS SISTEMAS DE DOS COMPONENTES

Las células vivas modulan la expresión de sus genes en respuesta a los cambios medioambientales que se producen a su alrededor. Para llevar a cabo esta modulación es necesario un sensor que detecte los cambios químicos o físicos que se han producido, y un regulador que induzca la respuesta a dichos cambios. En las bacterias, los cambios extracelulares son sentidos y transducidos dentro de la célula primordialmente por los SDC (Hoch, 2000; Stock et al., 2000; Skerker et al., 2008) (Fig. 2). Estos sistemas están constituidos, generalmente, por dos proteínas, una histidina quinasa (HQ) y un regulador de respuesta. La HQ responde a un determinado estímulo modificando el estado de fosforilación del regulador de respuesta (RR), que provoca la respuesta a dicha señal. La HQ generalmente es una proteína integral de membrana que se autofosforila en un residuo histidina conservado, utilizando como sustrato ATP y que posteriormente transfiere el grupo fosfato a un residuo aminoacídico conservado, generalmente un ácido aspártico. El cambio del estado de fosforilación del RR produce una modificación del dominio efector, que puede provocar: (i) su unión al DNA regulando la transcripción de algunos genes, (ii) realizar actividades enzimáticas, (iii) unirse al RNA o (iv) participar en una interacción proteína-proteína (Gao et al., 2007). Algunas HQ poseen la capacidad de revertir el estado de fosforilación del RR presentando una actividad fosfatasa. Generalmente, la proteína HQ y su correspondiente RR se encuentran codificados por un operón (Stock et al., 2000). Sin embargo, se han encontrado un gran número de miembros RR huérfanos de los SDC en los genomas de los microorganismos. Estos RR se denominan huérfanos porque su SDC carece de la proteína HQ. Por ejemplo, un 57 % de los SDC encontrados en el genoma de *Caulobacter crescentus* son huérfanos (Skerker et al., 2005), mientras que en *S. pneumoniae* solo se ha detectado un RR huérfano (Ulijasz et al., 2004).

Muchos de estos SDC son sistemas sofisticados de señales que se encuentran tanto en eubacterias como arqueas y también se encuentran en algunos organismos eucariotas, tales como levaduras y plantas (Stock et al., 2000). Sin embargo, su abundancia en cada dominio difiere sustancialmente, existiendo diferencias tanto en el

residuo conservado que se autofosforila en la proteína HQ como el grupo conservado al que se transfiere el fosfato. El sistema de fosfotransferencia histidina/aspártico se encuentra en la mayoría de SDC en eubacterias, siendo bastante raro en eucariotas, en los que los dominios de fosforilación predominantes son serina/treonina y tiroxina (Stock et al., 2000). Las señales medioambientales que detectan los SDC son de naturaleza variada, como cambios en la temperatura, la osmolaridad, el pH, la luz, el oxígeno o los nutrientes (Mascher et al., 2006). En las bacterias, el número de SDC depende de las especies, no existiendo ningún SDC en *Micoplasma genitalium* (Grebe y Stock, 1999) y siendo descritos por ejem. 13 sistemas en *S. pneumoniae* (Lange et al., 1999), 31 en *E. coli* (Zhou et al., 2003), y cerca de 30 en *Bacillus subtilis* (Kobayashi et al., 2001).



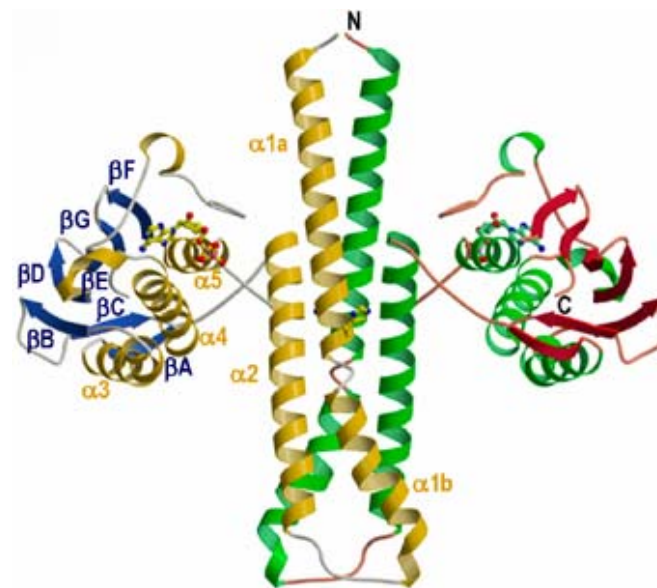
**Figura 2. Estructura esquemática de un SDC bacteriano.** La histidina quinasa es una proteína transmembranal que contiene un dominio sensor (DS), el dominio de transferencia del fosfato (H) y el dominio catalítico (DC). Una señal específica ambiental induce la autofosforilación de un residuo de histidina (His) localizado en el dominio H y el grupo fosfato es transferido a un aspártico (Asp) situado en el regulador de respuesta, que contiene un dominio receptor (RC) y un dominio efector (DE). La fosforilación del regulador de respuesta puede provocar su unión al DNA.

Existen varias diferencias que distinguen los SDC eucariotas de los procariotas. Las HQ en eucariotas son generalmente proteínas híbridas que contienen además dominios RR de interacción con el DNA, siendo una excepción *Arabidopsis* ERS (Hua et al., 1995). Sin embargo, es muy infrecuente detectar este tipo de HQ híbridas en

procariotas (5 de 30 HQ en *E. coli* son híbridas) (Mizuno, 1997). Los RR procariotas contienen, en su mayoría, un dominio de unión al DNA y actúan regulando la transcripción de algunos genes (en el caso de *E. coli* 25 de los 30 RR cumplen esta condición), mientras que sólo se conoce un caso de RR en eucariotas que contenga un dominio de unión al DNA (el regulador de respuesta SKN7 de *Saccharomyces cerevisiae*) (Brown et al., 1993). Tanto en procariotas como en eucariotas, el último paso de los SDC es generalmente la regulación de la expresión de determinados genes. En los procariotas la proteína que efectúa este último paso es el RR, mientras que en los eucariotas son otras proteínas reguladas por el SDC las responsables de la respuesta final. Además, existen secuencias específicas que permiten distinguir las proteínas HQ y RR eucariotas de las procariotas (Pao y Saier, 1997).

La HQ y el RR son proteínas modulares que contienen múltiples dominios homólogos y heterólogos. Las HQ han sido clasificadas en dos clases denominadas I y II basándose en la posición dentro de la secuencia del dominio de dimerización con respecto al dominio catalítico (Bilwes et al., 1999). La mayoría de las HQ presentes en las bacterias pertenecen a la Clase I y contienen dos fracciones altamente diferenciadas: la fracción N-terminal altamente variable y la fracción C-terminal altamente conservada. La fracción N-terminal forma el dominio sensor de la proteína, que generalmente es un dominio extracelular, y su variabilidad en secuencia y estructura refleja el amplio espectro de señales que los SDC pueden sensor. La fracción C-terminal es una fracción citoplásmica que presenta la maquinaria catalítica para la autofosforilación y fosfotransferencia. Esta fracción está dividida en dos dominios diferenciados estructuralmente: el dominio de dimerización que contiene la histidina conservada a la que se transfiere el grupo fosfato (dominio H) y el dominio catalítico que une la molécula de ATP (Parkinson y Kofoid, 1992; Dutta y Inouye, 2000) (Fig. 2). Hasta el momento, el único cristal obtenido de la región citoplásmica completa de una proteína histidina quinasa corresponde a la histidina quinasa HQ853 de *Thermotoga maritima* (Marina et al., 2005). La proteína purificada y posteriormente cristalizada es un homodímero, cuya estructura tridimensional cristalográfica de rayos X se muestra en la Figura 3. Cada monómero de este dímero contiene dos dominios distintos, uno en posición N-terminal que se encuentra formando una horquilla helicoidal y otro C-terminal formado por hélices  $\alpha/\beta$ , estando ambos dominios conectados por una pequeña región. La horquilla helicoidal está formada por dos hélices antiparalelas conectadas a través de nueve residuos. La hélice  $\alpha 1a$  contiene el residuo conservado de fosforilación

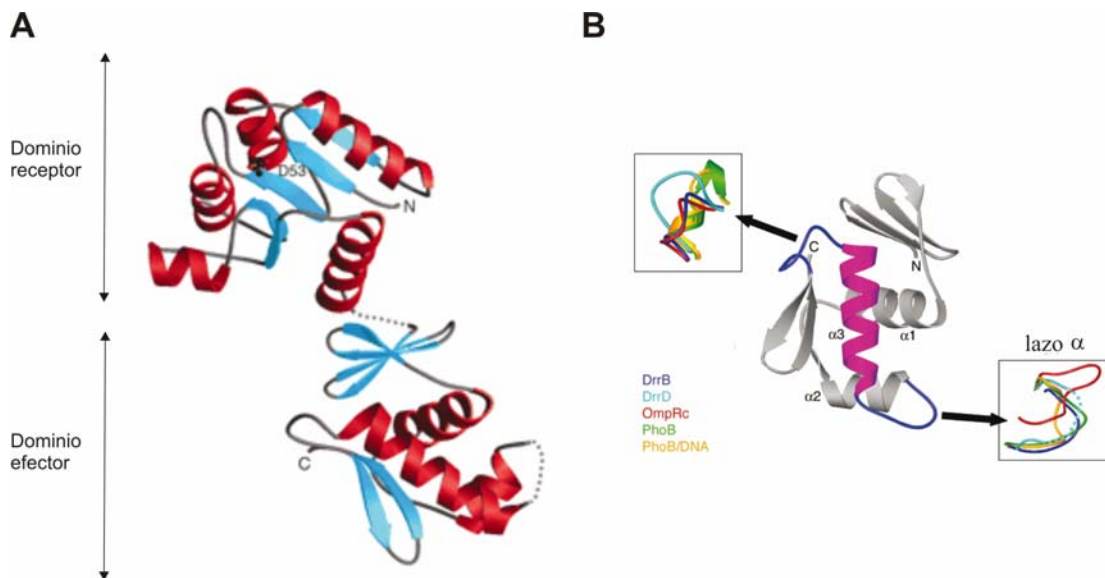
mientras que la hélice  $\alpha 1b$  contacta con las hélices  $\alpha 2$  y  $\alpha 2'$  de manera simétrica. El dominio C-terminal está formado por un sándwich  $\alpha/\beta$ , que consiste en una capa de láminas  $\beta$  formada por cinco cadenas ( $\beta B$ ,  $\beta D$ - $\beta G$ ) y otra capa compuesta de tres  $\alpha$  hélices ( $\alpha 3$ - $\alpha 5$ ). Este dominio contiene un par de pequeñas cadenas  $\beta$  antiparalelas ( $\beta A$  y  $\beta C$ ) y un puente disulfuro que une el segmento N-terminal de la hélice  $\alpha 3$  con la lámina  $\beta C$ . El dominio de unión a ATP (dominio catalítico) es similar en estructura a los dominios quinasas aislados de PhoQ (Marina et al., 2001), CheA (Bilwes et al., 1999), EnvZ (Tanaka et al., 1998) y NtrB (Song et al., 2004) y se encuentra situado entre la lámina  $\beta D$  y la hélice  $\alpha 5$ . La gran distancia que existe entre el sitio de unión a ATP y la histidina fosfoaceptora sugiere que la región sensora de la HQ debe tener acceso a múltiples cambios conformacionales, de forma que pueda acercarse la región catalítica a la región de dimerización (Marina et al., 2005).



**Figura 3. Estructura tridimensional de la región citoplásmica de la HQ de *T. maritima*.** Representación del dímero cristalográfico HQ853-CD. Las  $\alpha$  hélices ( $\alpha 1$ - $\alpha 5$ ) están coloreadas en amarillo (subunidad A) y en verde (subunidad B). Las cadenas  $\beta$  ( $\beta A$ - $\beta F$ ) aparecen coloreadas en azul (subunidad A) y rojo (subunidad B). La posición de los extremos C y N terminales está indicada en la subunidad B. El sitio de unión del ATP y el residuo fosfoaceptor (histidina conservada) se encuentran representados por bolas azules unidas por fragmentos amarillos. Adaptado de Marina y cols. (Marina et al., 2005).

La proteína RR comprende dos dominios, el dominio receptor y el dominio efector (Parkinson y Kofoid, 1992) (Fig. 2). El dominio receptor contiene el aspártico conservado al que se transfiere el grupo fosfato desde la HQ. El dominio efector es el

responsable de la respuesta específica a un determinado estímulo (West y Stock, 2001), al contener el sitio de unión al DNA. Algunas HQ y RR también contienen dominios denominados PAS, que son capaces de sensar el potencial redox (Zhulin et al., 1997; Galperin et al., 2001) o dominios parecidos al SH3 (Bilwes et al., 1999), que media la formación de complejos de proteínas. Los RR pueden clasificarse por homología en sus dominios efectores (Stock et al., 1989) y se subdividen en tres familias denominadas OmpR/PhoB, NarL/FixJ y NtrC/DctD. Los miembros de la familia OmpR/PhoB comprenden aproximadamente el 40 % de todos los reguladores de respuesta y han sido relativamente resistentes a la cristalización. Uno de los primeros miembros que ha sido purificado y cristalizado en forma monomérica es el DrrD de *T. maritima* (Robinson et al., 2003). En este RR (Fig. 4A), el dominio receptor tiene topología de sandwich  $\alpha/\beta$ , con un cuerpo central de 5 cadenas  $\beta$  paralelas alrededor de dos  $\alpha$  hélices en una cara y tres en la otra. La fosforilación tiene lugar en un aspártico altamente conservado (D53) y posicionado en un extremo de la cadena  $\beta$  central ( $\beta_3$ ) y la transferencia del grupo fosfato al aspártico se promueve por autocatálisis dependiente de magnesio, que está unido cerca del sitio de fosforilación por residuos ácidos conservados.

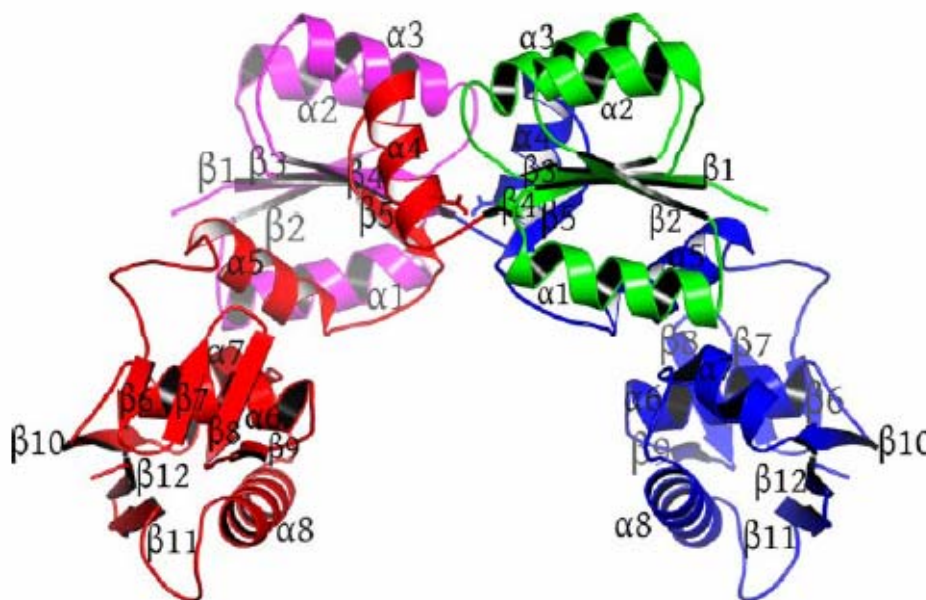


**Figura 4. Estructura molecular del regulador de respuesta DrrD de *T. maritima*.** (A) Representación del monómero cristalográfico DrrD. Las  $\alpha$  hélices están coloreadas en azul. Las cadenas  $\beta$  están coloreadas en rojo. La posición del extremo C (dominio receptor) y N terminal (región efectora) está indicada. El sitio de unión del ATP se encuentra representado por bolas azules (D53). (B) Representación del dominio efector de DrrD. En rosa se muestra la  $\alpha$  hélice que interacciona con el surco mayor del DNA. Se puede observar una comparación de los lazos  $\alpha$  de diferentes RR de la familia OmpR/PhoB, mostrando que la conformación de estos lazos es bastante flexible. Adaptado de Robinson y cols. (Robinson et al., 2003).



El dominio efector está compuesto por 4 cadenas  $\beta$  antiparalelas seguidas por 3  $\alpha$  hélices y una horquilla de láminas  $\beta$  antiparalelas en el extremo C terminal. La hélice  $\alpha_3$  es el lugar de interacción entre los RR de esta familia y el surco mayor del DNA. Entre las hélices  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  existe un lazo  $\alpha$  o lazo de transactivación, existiendo otro lazo entre la hélice  $\alpha_3$  y la horquilla de láminas  $\beta$  antiparalelas en el extremo C terminal. Estos lazo de transactivación poseen una estructura flexible (Fig. 4B). La estructura de PhoB/DNA (Blanco et al., 2002) indica que estos lazos flexibles se utilizan para la unión y reconocimiento del DNA y también para la mediación de las asociaciones proteína-proteína. El incremento de la flexibilidad de estas regiones quizá contribuya a su fijación optima a las superficies implicadas en los contactos proteínas-DNA o proteínas-proteínas (Fig. 4B).

Tanto en éste como en otros RR de la familia OmpR/PhoB, las áreas de contacto entre moléculas (monómeros) están mediadas por las regiones  $\alpha_4$ -  $\beta_5$ -  $\alpha_5$  del dominio receptor, tal y como se comprobó en el RR RegX3 de *Mycobacterium tuberculosis* (King-Scott et al., 2007) (Fig. 5).



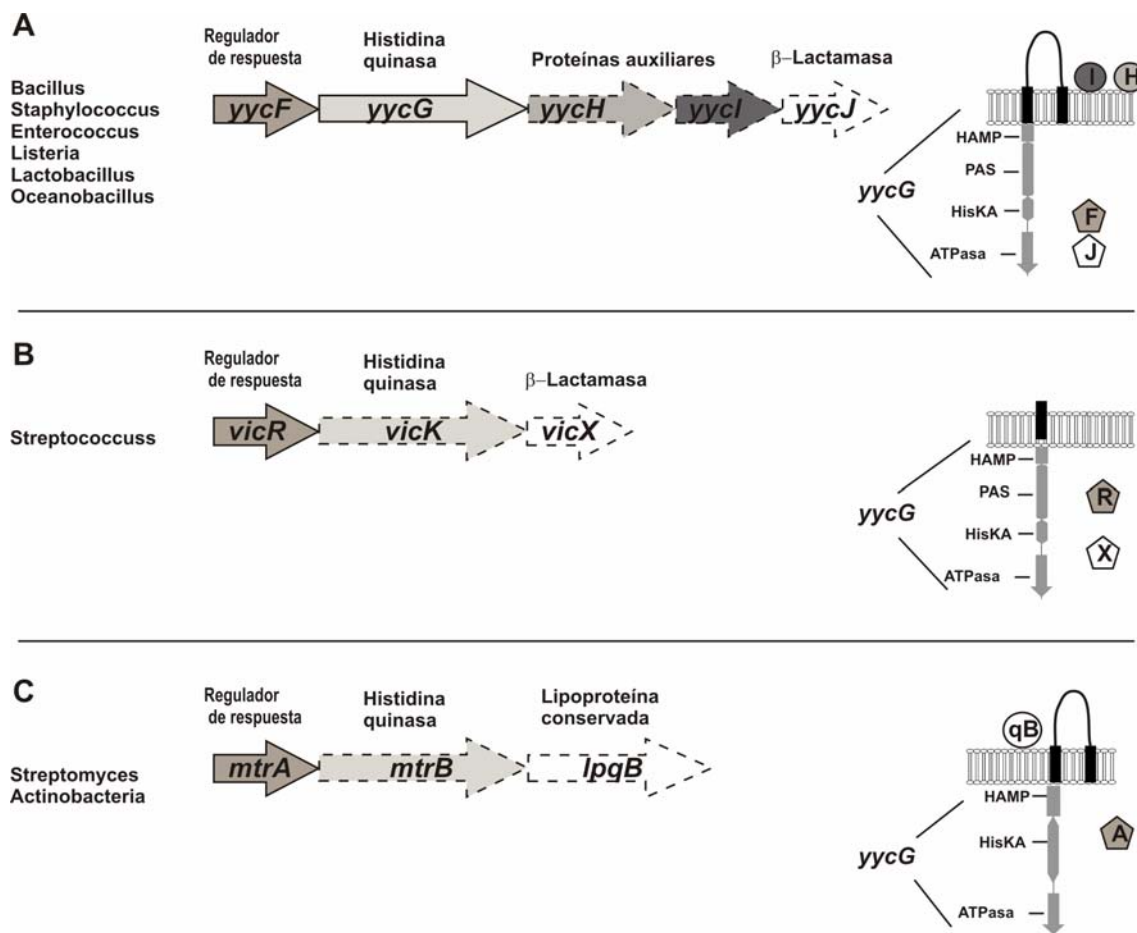
**Figura 5. Estructura molecular del regulador de respuesta RegX3 de *Mycobacterium tuberculosis*.** Representación del dímero cristalográfico RegX3. Este dímero está formado por dos moléculas, una coloreada de rojo y verde y la otra coloreada de azul y magenta. El dominio receptor de ambas moléculas, representados por verde y magenta, están formados cada uno de ellos, por las láminas  $\beta$  denominadas  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  y las hélices  $\alpha$  denominadas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  y al unirse los dos dominios receptores completan la formación de las regiones  $\alpha_4$ ,  $\beta_5$  y  $\alpha_5$  de la molécula 1 (roja y verde). Lo mismo ocurre con la molécula 2 (azul y magenta), estando el área de contacto de estas moléculas en estas estructuras ( $\alpha_4$ ,  $\beta_5$  y  $\alpha_5$ ).

### 3. EL SISTEMA DE DOS COMPONENTES ESENCIAL

Los SDC son sistemas regulatorios celulares implicados en mantener el equilibrio homeostático bajo una amplia variedad de condiciones ambientales (Hoch y Varughese, 2001; Groisman y Mouslim, 2006; Mascher et al., 2006; Gao et al., 2007). Entre los SDC bacterianos, el sistema YycFG ha sido ampliamente estudiado por diversos motivos. Este sistema está altamente conservado en bacterias gram positivas que contiene bajo contenido en G+C y es esencial para la viabilidad celular en muchos de los organismos en los que este SDC ha sido estudiado (Fabret y Hoch, 1998; Martín et al., 1999; Wagner et al., 2002; Hancock y Perego, 2004). Esta esencialidad puede deberse al control de funciones esenciales como la biosíntesis de mureína (Howell et al., 2003; Dubrac y Msadek, 2004; Liu et al., 2006; Ahn y Burne, 2007; Bisicchia et al., 2007; Dubrac et al., 2007), división celular (Fabret y Hoch, 1998; Fukuchi et al., 2000; Howell et al., 2003), control de la composición de la membrana celular (Martín et al., 1999; Bisicchia et al., 2007), biosíntesis de exopolisacáridos y formación de biofilm (Senadheera et al., 2005; Shemesh et al., 2006; Ahn y Burne, 2007) y expresión de factores de virulencia (Kadioglu et al., 2003; Senadheera et al., 2005; Liu et al., 2006; Ahn et al., 2007; Dubrac et al., 2007).

Los componentes principales de este SDC están formados por la histidina quinasa sensora YycG y el regulador de respuesta YycF. Como este SDC fue descubierto independientemente en diferentes especies bacterianas, existen diferentes nombres para denominarlo WalK/R en *S. aureus* (Dubrac et al., 2007), MicA/B en *S. pneumoniae* (Echenique y Trombe, 2001), VicR/K en *Streptococcus mutans* (Senadheera et al., 2005) y YycFG en *B. subtilis* (Bisicchia et al., 2007), etc.. La designación como YycFG procede de *B. subtilis* (Fig. 6A), siendo posteriormente esta nomenclatura ampliada a otras especies bacterianas diferentes de *Streptococcus*, donde en la mayoría de publicaciones se ha designado como VicRK (Fig. 6B). Las diferencias de nombre entre las HQ YycG y VicK se deben a diferencias estructurales que existen entre ambas (Wagner et al., 2002; Szurmant et al., 2005; Szurmant et al., 2007b). YycG contiene un dominio extracelular entre dos dominios transmembrana, mientras que en las especies del género *Streptococcus* esta histidina quinasa se encuentra anclada a la membrana celular por un solo dominio transmembrana (Wagner et al., 2002; Ng y Winkler, 2004), siendo este dominio transmembrana de mayor o menor longitud dependiendo de la especie, con la excepción de *Lactococcus lactis*, que contiene dos

dominios transmembrana pero carece de dominio extracelular (Ng y Winkler, 2004) (Fig. 6).



**Figura 6. Organización de los genes en los operones que codifican el SDC esencial YycFG, VicRK o MrtAB y estructura de las HKs homólogas a YycG.** Representación de los operones en las especies representativas *B. subtilis* (A), *S. pneumoniae* (B) y *Streptomyces coelicolor* (C). Los genes esenciales están dibujados en línea continua, mientras que en línea discontinua se encuentran los no esenciales. Los genes homólogos están representados en el mismo color. Existe un sexto gen, *yycK*, situado a continuación de *yycJ*, de función desconocida se encuentra en las especies *Bacillus*, *Listeria*, *Lactobacillus* y *Oceanobacillus*, no encontrándose en las especies de los géneros *Staphylococcus* y *Enterococcus*. El dominio citoplásmico de YycG es similar al de VicR y contiene el dominio de unión que conecta el la región transmembrana con el dominio citoplásmico (HAMP), el dominio de dimerización y transferencia de la histidina kinasa (HisKA), dominio catalítico ATPasa (HATPasa) y el dominio PAS, mientras que la histidina quinasa de *Streptomyces* carece del dominio PAS. La mayoría de las YycG, excepto la del género *Streptococcus*, contiene dos dominios transmembrana que flanquean una región extracelular. Las proteínas extracelulares YycH e YycI (círculos marcados como H e I) y la lipoproteína LpqB (círculo marcado como qB) intervienen en la señalización de YycG tanto en el caso A como en el C. Las funciones de las proteínas citoplásmicas YycJ y VicX (pentágonos marcados como J y X) no tienen una función conocida. Los reguladores de respuesta YycF, VicR y MtrA están representados por pentágonos del mismo color marcados como F, R y A.

Tanto VicK como YycG contienen un dominio similar HAMP, que conecta la región transmembrana con el dominio citoplásmico, jugando un papel fundamental en la traducción de la señal (Kishii et al., 2007), un dominio PAS a lo largo del dominio de

fosfotransferencia y de dimerización de la HQ (HiskA), y el dominio ATPasa (Mascher et al., 2006) (Fig. 6). A diferencia del YycG y de VicK, tanto el dominio receptor como el dominio efector de los reguladores de respuesta YycF y VicR están altamente conservados y pertenecen a la familia de los reguladores de respuesta OmpR (Stock et al., 2000; Gao et al., 2007).

En todas las estirpes en las que se ha estudiado este SDC, el gen que codifica para el regulador de respuesta YycF (VicR) no puede ser interrumpido, siendo esencial para el crecimiento en medios de cultivo de laboratorio. Por el contrario, no todas las HQ son esenciales, siendo esencial el gen que codifica YycG pero no el que codifica VicK, que no es indispensable en las especies del género *Streptococcus* (Echenique y Trombe, 2001; Wagner et al., 2002; Senadheera et al., 2005; Liu et al., 2006).

Las proteínas auxiliares del SDC YycFG (VicRK), también influyen en su función y esencialidad. En todas las bacterias que contienen este SDC, los genes que codifican la HQ y el RR son cotranscritos con un gen que codifica un tercer componente, denominado YycJ en *B. subtilis* y en otras especies y VicX en las especies de *Streptococcus* (Fig. 6). En otras especies diferentes del género *Streptococcus*, además de este tercer gen, existen otros dos genes que son cotranscritos, denominados *yycH* e *yycI* y que también forman parte del SDC (Wagner et al., 2002; Szurmant et al., 2007b). Estas proteínas auxiliares YycJ (VicX), YycH y YycI no son indispensables para el crecimiento de la bacteria. La proteína citoplásmica YycJ (VicX) es una proteína cuyo sitio catalítico es similar al de una  $\beta$ -lactamasa y su función es desconocida (Wagner et al., 2002). En el caso de YycJ e YycI, existen mayores conocimientos en cuanto a su función y su estructura. Ambas proteínas están ancladas a la membrana y contienen un dominio extracelular (Stock et al., 2000). El análisis de estirpes mutantes de *B. subtilis* carentes de estas dos proteínas indicó que ellas actúan como supresores, permitiendo el crecimiento de los mutantes sensibles a temperatura de YycF (Szurmant et al., 2007a; Szurmant et al., 2007b). Estas proteínas regulan negativamente la autofosforilación de YycG, de forma que los mutantes incrementan la fosforilación del YycF. Así, cambios en la función de las proteínas auxiliares afectan a la forma activa de YycF.

Existe una gran similitud entre los SDC YycFG (VicRK) y un SDC esencial altamente conservado en bacterias gram positivas con un alto contenido en G+C como *Actinobacteria* y entre las que se incluyen especies interesantes para la industria como *Streptomyces* y para la medicina como *Mycobacterium* y *Corynebacterium*. Este SDC esencial, denominado MtrAB (Hoskisson y Hutchings, 2006), presenta varias

similitudes con el SDC YycFG (VicRK). Al igual que en el caso de *Streptococcus*, el regulador de respuesta MtrA es esencial para el crecimiento de *Mycobacterium* y *Streptomyces*, mientras que su HQ, MtrB, no es esencial (Fig. 6) (Zahrt y Deretic, 2000; Cangelosi et al., 2006). Este SDC MtrAB, juega un papel fundamental en la división celular y biosíntesis de envueltas celulares (Moker et al., 2004; Brocker y Bott, 2006), similar al papel que ejerce el sistema YycFG en algunas bacterias gram positivas con bajo contenido en G+C (Dubrac et al., 2007; Szurmant et al., 2007a). El sistema MtrAB participa en la regulación de la homeostasis de la superficie celular, regulando diferentes genes en las distintas especies, al igual que el sistema YycFG (VicRK) (Martín et al., 1999). Similar a las proteínas auxiliares YycHI en *B. subtilis* es la proteína LpqB, que también participa en el control de la actividad de la HQ MtrB (Hoskisson y Hutchings, 2006). Por lo tanto, todas las bacterias gram positivas contienen un SDC esencial que parece estar implicado en el mantenimiento de la pared celular y la homeostasis, respondiendo así a determinados estímulos como señales celulares, diferentes condiciones de estrés, o ambos.

Este alto grado de esencialidad en diferentes bacterias gram positivas y su alto grado de conservación nos indican que este sistema puede ser una buena diana para el desarrollo de nuevos antibióticos. A partir de ahora, y debido al alto grado de homología que existe entre los diferentes sistemas esenciales, nos referiremos a ellos con el nombre genérico de YycFG.

#### 4. BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS EN BACTERIAS

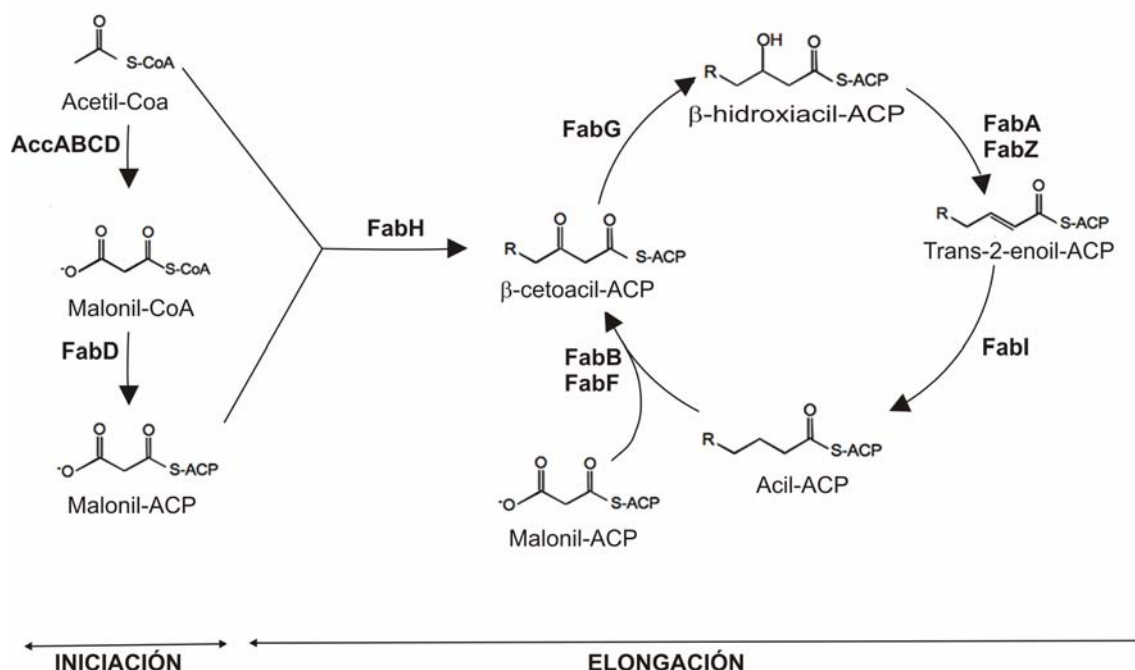
Uno de los requerimientos necesarios pero no suficientes para que un agente antibacteriano sea efectivo es que actúe contra una reacción o ruta metabólica esencial para el organismo infeccioso. Como hemos indicado anteriormente, la mayoría de los antibióticos ejercen su acción en la síntesis de pared celular, síntesis de proteínas, síntesis de ácidos nucleicos o en la alteración de la membrana citoplasmática. Actualmente, y por un amplio número de razones, la ruta de la biosíntesis de ácidos grasos es un blanco fundamental para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos. El uso extendido de antibióticos anti-tuberculosis como la isoniacida y el triclosan, ambos inhibidores de la biosíntesis de ácidos grasos, han validado esta ruta como diana para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos (Lu y Tonge, 2008). La

organización de los componentes de la ruta de la biosíntesis de ácidos grasos es diferente en los mamíferos (tipo FAS I) y en las bacterias, las plantas y los parásitos (tipo FAS II), lo que incrementa la probabilidad de desarrollar agentes antibacterianos específicos para una determinada diana, no afectando a la diana del huésped. La biosíntesis de ácidos grasos, en la mayoría de las bacterias, está catalizada por una serie de pequeñas proteínas, cada una de ellas codificada por un determinado gen (tipo FAS II), en contraste con el tipo FAS I de eucariotas, en los que todo el proceso de la biosíntesis de ácidos grasos es realizado generalmente por una única proteína multifuncional en forma de homodímero o por dos cadenas heterodímeras que contienen todas las proteínas implicadas en esta ruta biosintética (Heath et al., 2001). El alto grado de conservación en muchos de los componentes del sistema FAS II hace de esta ruta biosintética un objetivo ideal para el desarrollo de antibióticos de amplio espectro.

Los ácidos grasos son componentes esenciales de la membrana y una importante fuente de energía metabólica en todos los organismos. Así, la biosíntesis o degradación de los ácidos grasos debe llevarse a cabo dependiendo de la capacidad de ellos para mantener la homeostasis de la membrana lipídica. La regulación de esta ruta biosintética ha sido muy estudiada en un modelo procariota, *E. coli* (Rock y Cronan, 1996; Cronan y Subrahmanyam, 1998; Zhang et al., 2002). En los últimos 5 años, la regulación global de la ruta metabólica de los ácidos grasos también ha sido estudiada en otras bacterias en las que se han detectado diferencias en los mecanismos de control, como es el caso de *B. subtilis* (Schujman et al., 2003; Schujman et al., 2006) y *S. pneumoniae* (Lu y Rock, 2006; Altabe et al., 2007).

La síntesis de ácidos grasos en procariotas es un proceso en el que se pueden distinguir dos fases claramente diferenciadas: la fase de iniciación y la fase de elongación. La fase de iniciación comienza con la enzima acetil-CoA carboxilasa, que cataliza la formación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA y bicarbonato. Esta enzima es un heterotetrámero constituido por las subunidades AccA, AccB, AccC y AccD) (Cronan y Waldrop, 2002). En la segunda fase de la etapa de la iniciación el grupo malonato del malonil-CoA es transferido a una molécula de ACP por la malonil-CoA:ACP transacilasa (FabD), formándose así una cadena creciente de ácido graso, que pasa posteriormente a la fase de elongación. En esta fase, la cadena creciente de ácido graso, unida a la proteína transportadora de acilos (ACP) se condensa con una molécula de malonil-ACP, liberándose CO<sub>2</sub>, ACP y formándose un 3-cetoacil-ACP (Fig. 7). Este

cetoacil-ACP es posteriormente reducido a 3-hidroxiacil-ACP, deshidratado a 2-enoil-ACP y reducido nuevamente para dar un acil-ACP con dos carbonos más que al inicio del ciclo. Este proceso tiene como cosustrato a la malonil-CoA, que se sintetiza a partir de acetil-CoA y bicarbonato. Las enzimas implicadas en la fase de elongación difieren en distintas bacterias y serán detalladas en los apartados correspondiente.



**Figura 7. Biosíntesis de los ácidos grasos.** Acetil-CoA es carboxilado por el heterotetrámero AccABCD para formar Malonil-CoA, que después es transferido a una molécula de ACP por FabD. La biosíntesis de ácidos grasos continúa con un ciclo de condensación (FabH, FabB y FabF), reducción (FabG), deshidratación (FabA y FabZ) y otra posterior reducción (FabI, FabK). Las designaciones de los ácidos grasos son genéricas y varían dependiendo del número de carbonos que contengan. Con flechas se indican los pasos que comprenden el ciclo de iniciación y elongación.

La biosíntesis de ácidos grasos está altamente coordinada con la síntesis de fosfolípidos, que provocan el crecimiento de la bacteria y la respuesta a los cambios ambientales. La proteína PlsB regula la formación de estos fosfolípidos, de forma que, cuando esta enzima se encuentra inhibida, el producto final de la biosíntesis de los ácidos grasos vuelve al paso inicial de la fase de elongación, produciéndose ácidos grasos de cadena larga por la incorporación de dos carbonos más.

La supervivencia de las bacterias depende del mantenimiento de la homeostasis por su membrana lipídica y por su capacidad de ajustar la composición lipídica para aclimatar la bacteria a diversos ambientes (Zhang y Rock, 2008). Las cadenas de

fosfolípidos también determinan la viscosidad y fluidez de la membrana, que puede afectar a diversas funciones cruciales de la membrana, tales como la permeabilidad pasiva de moléculas hidrofóbicas, transporte de determinados compuestos o interacciones proteína-proteína. Así, las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos que permiten un fino control de la expresión de genes responsables de la formación de los ácidos grasos. En bacterias gram negativas, se ha estudiado como bacteria modelo *E. coli*, mientras que en bacterias gram positivas se han detectado diferencias significativas en *B. subtilis* y *S. pneumoniae*.

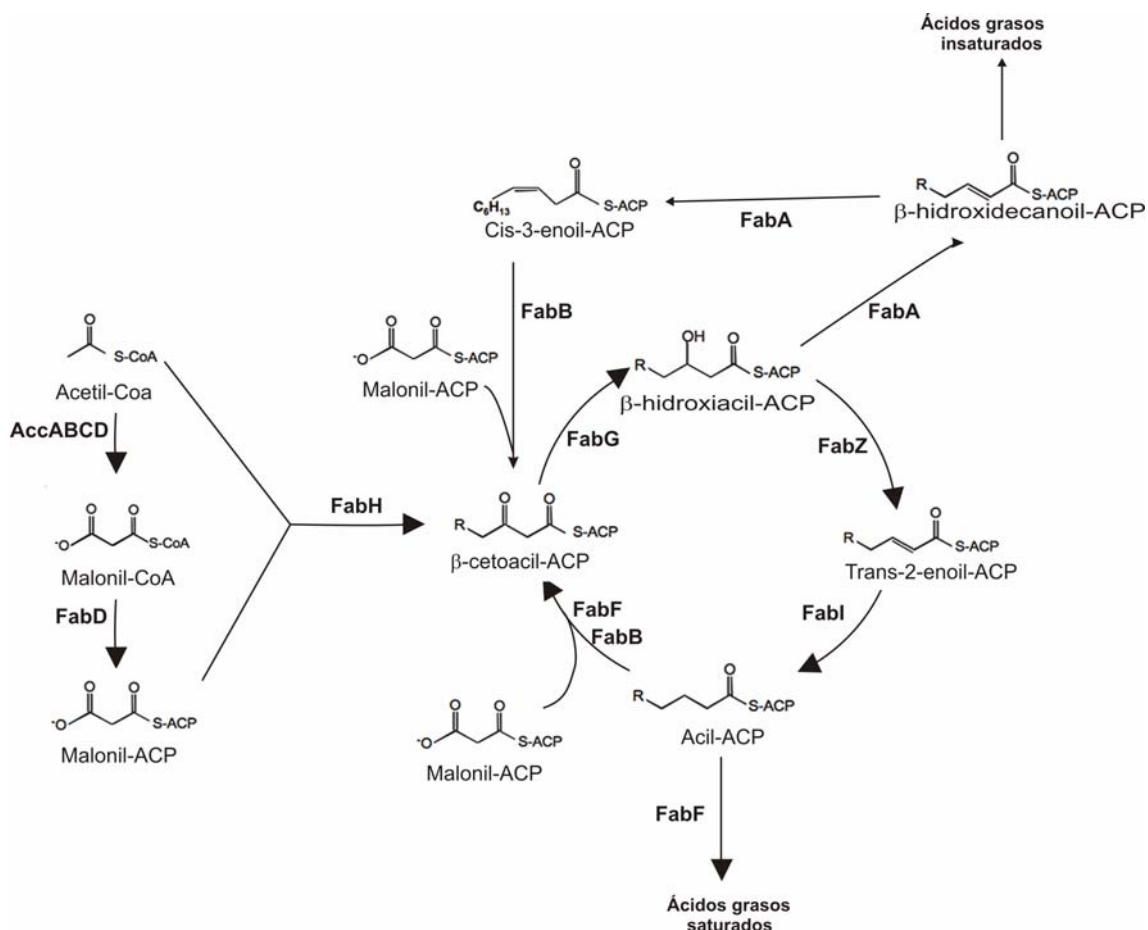
#### **4. 1. Biosíntesis y regulación de los ácidos grasos en *E. coli***

La biosíntesis de ácidos grasos en *E. coli* se inicia, al igual que en el resto de organismos procariotas, con la síntesis de malonil-ACP, generándose así un precursor de ácidos grasos que posteriormente pasará a alongarse. Esta elongación consiste en la condensación de grupos acilos, derivados del acil-CoA o del acil-ACP, con malonil-ACP catalizada por las 3-cetoacil-ACP sintetasas. Existen dos grupos de estas enzimas. La primera clase, la enzima 3-cetoacil-ACP sintetasa III (FabH) es la responsable de la iniciación de la elongación de los ácidos grasos y utiliza acil-CoA para la condensación. La segunda clase de enzimas (FabF y FabB), son las responsables de las siguientes rondas de elongación de los ácidos grasos. Cada ciclo de reducción, deshidratación y posterior reducción para producir acil-ACP está catalizado por las enzimas 3-cetoacil-ACP reductasa (FabG), 3-hidroxiacil-ACP deshidratasa (FabZ) y enoil-ACP reductasa dependiente de NAD (P) H (FabI). Los ciclos posteriores son iniciados por FabB y FabF. Estos ciclos de biosíntesis de ácidos grasos están regulados por la inhibición de AccABCD (Davis y Cronan, 2001) y FabH y FabI (Heath y Rock, 1996a, b) por el producto final acil-ACP (Fig. 8).

Solo dos únicas reacciones bioquímicas, catalizadas por FabA y FabB, son específicamente necesarias para producir los ácidos grasos insaturados en *E. coli* (Lu et al., 2004; Schujman y de Mendoza, 2005) (Fig. 8). En *E. coli* existen dos 3-hidroxiacil-ACP hidratasa (FabA y FabZ). FabZ está implicada en la deshidratación de todas las cadenas de ácidos grasos de diferente longitud (Mohan et al., 1994), mientras que la actividad de FabA está restringida a los ácidos grasos de 10 carbonos de longitud. Esta enzima, además de catalizar la deshidratación, también cataliza la isomerización de un



ácido graso, introduciendo así el producto de la reacción en la ruta de la síntesis de ácidos grasos insaturados. FabB es necesario para la elongación del *cis*-3-decenoil-ACP producido por FabA y es un factor determinante para el contenido de ácidos grasos insaturados en la célula (Clark et al., 1983).



**Figura 8. Biosíntesis de los ácidos grasos en *E. coli*.** Representación de la ruta biosintética de los ácidos grasos saturados e insaturados en *E. coli*. Las designaciones de los ácidos grasos son genéricas y varían dependiendo del número de carbonos que contengan.

El factor transcripcional que regula la biosíntesis y degradación de los ácidos grasos en *E. coli* es FadR (Cronan y Subrahmanyam, 1998). La ruta degradativa de los ácidos grasos en *E. coli*, codificada por los genes *fad*, es inducible. FadR en este caso actúa como un represor transcripcional, controlando la transcripción de los genes implicados en la oxidación de los ácidos grasos. En ausencia de ácidos grasos, FadR se une a la región promotora de los genes *fad*, reprimiendo su transcripción interfiriendo en el progreso de la RNA polimerasa. En presencia de ácidos grasos, éstos se unen a FadR

provocando un cambio conformacional que impide esta unión (Cronan, 1997; DiRusso et al., 1998).

FadR actúa como activador de la transcripción de *fabA* (Nunn et al., 1983), y de *fabB* (Campbell y Cronan, 2001), que codifican respectivamente FabA y FabB, enzimas esenciales para la síntesis de ácidos grasos insaturados, regulando así su producción (Fig. 8).

## 4. 2. Biosíntesis y regulación de los ácidos grasos en *B. subtilis*

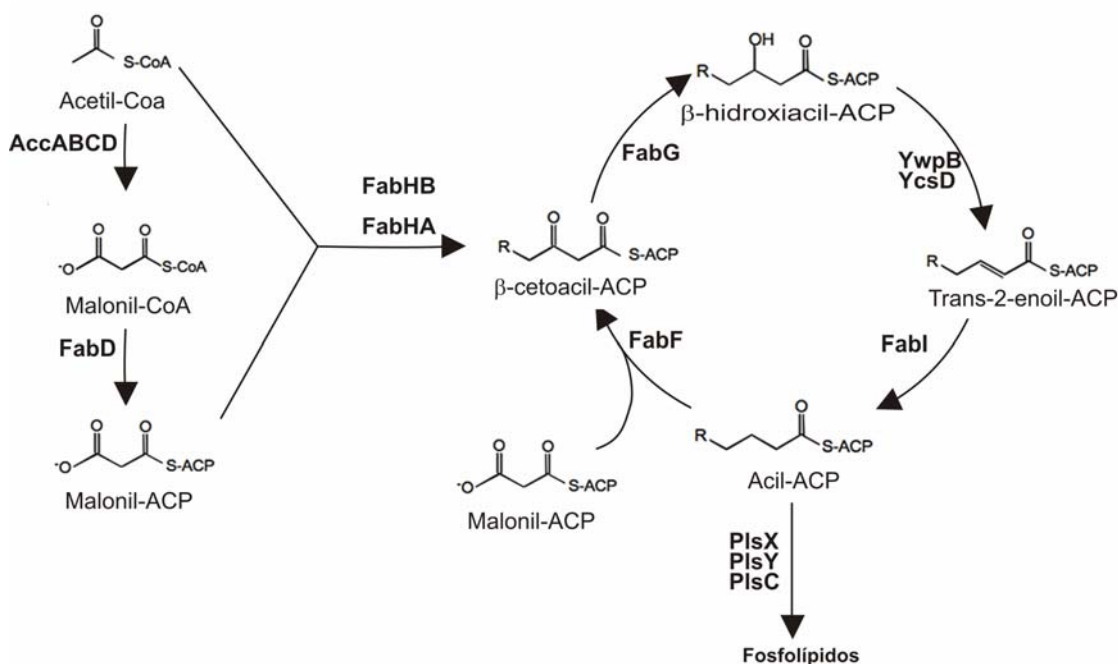
En contraste con *E. coli* que posee ácidos grasos lineales, *B. subtilis* posee ácidos grasos lineales y también ramificados. Este microorganismo posee dos isoenzimas FabH (llamadas FabHA y FabHB) que se diferencian de la enzima de *E. coli* en que ellas pueden iniciar el ciclo de la síntesis de los ácidos grasos lineales o ramificados por la condensación de malonil-ACP con acetil-CoA, isobutiril-CoA, isovaleril-CoA o  $\alpha$ -metilbutiril-CoA (Choi et al., 2000). Aunque *E. coli* produce dos tipos de enzimas condensantes para la elongación de los ácidos grasos (FabB y FabF), en *B. subtilis* sólo FabF es enzima condensante y responsable de la posterior elongación de los ácidos grasos (Schujman et al., 2001) (Fig. 9).

La regulación de la biosíntesis de ácidos grasos y fosfolípidos corre a cargo de FapR, un represor transcripcional que controla la expresión del regulon *fap* implicado en la biosíntesis de ácidos grasos y fosfolípidos. Los miembros del regulón *fap* son *fabHA-fabF*, *fapR-plsX-fabD-fabG*, *fabI*, *fabHB*, *yhfC* y *plsC* (*plsX* y *plsC* están implicados en la biosíntesis de fosfolípidos) (Schujman et al., 2003).

FapR es una proteína altamente conservada en muchos organismos gram positivos. Este gen está presente en todas las especies de los géneros *Bacillus*, *Listeria* y *Staphylococcus*, y también en *Clostridium* y otros géneros relacionados, y está asociado con el gen *plsX*, como en *B. subtilis* (Schujman et al., 2003).

FapR actúa como un represor de los genes de la biosíntesis de ácidos grasos y de los primeros pasos de la síntesis de fosfolípidos, tales como *plsX*. Este represor transcripcional está regulado por la concentración intracelular de malonil-CoA, un intermediario esencial en la síntesis de ácidos grasos en las células. Así, malonil-CoA actúa como señal reguladora de la actividad de FapR para controlar la homeostasis de la membrana lipídica. La expresión de los genes *acc* que codifican la acetil-CoA

carboxilasa se encuentra bajo el control de otros factores que enlazan con la formación de la biosíntesis de ácidos grasos. En *E. coli* estos factores son de la tasa de crecimiento (Li y Cronan, 1993) y el control autoregulatorio mediante AccB (James y Cronan, 2004). Aunque no se ha demostrado directamente en el sistema de *Bacillus*, la acetil-CoA carboxilasa también puede estar sujeta a estas formas de regulación.



**Figura 9. Biosíntesis de los ácidos grasos en *B. subtilis*.** Representación de la ruta biosintética de los ácidos grasos en *B. subtilis*. Las designaciones de los ácidos grasos son genéricas y varían dependiendo del número de carbonos que contengan.

*Bacillus subtilis* carece de la ruta de formación de ácidos grasos insaturados FabAB de *E. coli*. Sin embargo, posee la ruta Des, que regula la síntesis de una enzima de unión a membrana, la enzima  $\Delta 5$ -desaturasa (DesA), que sintetiza ácidos grasos ramificados en la forma iso- y anteiso- (Mansilla et al., 2004; Schujman y de Mendoza, 2005). Así, cuando la bacteria está sujeta a un cambio brusco de temperatura, los fosfolípidos existentes son desaturados para incrementar la fluidez de la membrana lipídica (Aguilar et al., 2001; Lu et al., 2004). Esta reacción es llevada a cabo por DesA, una desaturasa unida a la membrana que introduce un doble enlace en la posición 5 de la cadena de ácidos grasos o en los fosfolípidos (Altabe et al., 2003). El gen *desA* está altamente regulado por un SDC compuesto por los genes *desK* y *desR*, localizados en un operón adyacente al gen *desA*. DesK es una HQ sensora que responde a un descenso de

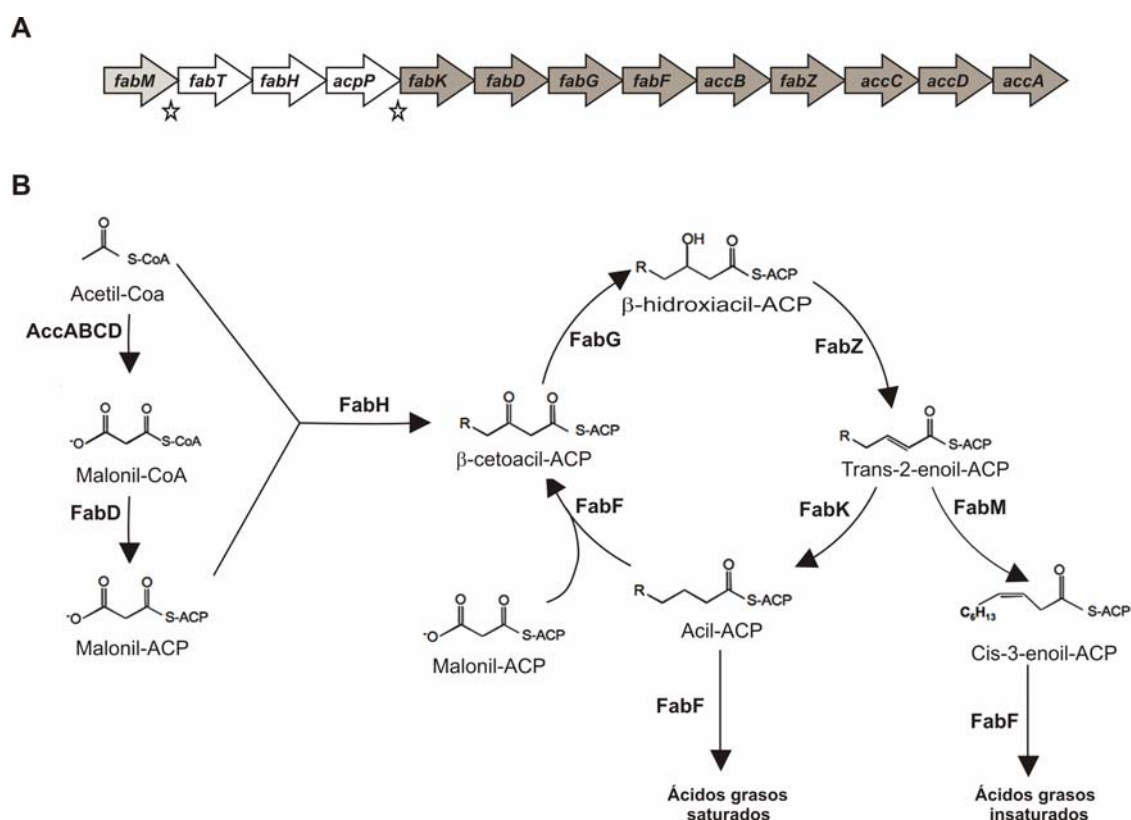
la fluidez de la membrana lipídica y DesR es el RR del sistema (Cybulski et al., 2002). Sólo la forma fosforilada de DesR es capaz de unirse a la región reguladora que se encuentra situada delante del promotor del gen *Δ5-Des* (Cybulski et al., 2004), que codifica la proteína DesA.

#### **4. 3. Biosíntesis y regulación de los ácidos grasos en *S. pneumoniae***

*S. pneumoniae* produce el mismo espectro de ácidos grasos saturados e insaturados que *E. coli*, pero las reacciones de la biosíntesis de ácidos grasos están catalizadas por enzimas diferentes. En *E. coli*, los ácidos grasos insaturados requieren la acción de dos enzimas, FabA y FabB (Rock y Cronan, 1996). *S. pneumoniae* carece de ambas enzimas y utiliza una única enzima con función isomerasa codificada por el gen *fabM* (Marrakchi et al., 2002). Otra diferencia se encuentra en la enoil-ACP reductasa, que en *E. coli* es una enzima dependiente de NADH, FabI, mientras que en *S. pneumoniae* es una flavoproteína, FabK (Marrakchi et al., 2003). Estas diferencias hacen que en *S. pneumoniae* la ramificación de los ácidos grasos insaturados se forme en un paso posterior al de *E. coli*. Así, en *S. pneumoniae* la formación del ácido graso insaturado tiene lugar tras la formación de trans-2-decenoil-ACP, mientras que en *E. coli* se produce después de la formación del β-hidroxidecanoil-ACP (Marrakchi et al., 2002). *S. pneumoniae* contiene una única enzima condensante, FabF, mientras que en *E. coli* existen dos, FabB y FabF. Esta enzima, al igual que ocurre en *E. coli* (Rock y Cronan, 1996), juega un papel muy importante en el control del grado de instauración y la longitud de la cadena de los ácidos grasos (Lu y Rock, 2006) (Fig.10).

Todos los genes requeridos para la biosíntesis de ácidos grasos insaturados se encuentran localizados en un solo grupo en el genoma de *S. pneumoniae*, en el siguiente orden *fabM*, *fabT*, *fabH*, *acpP*, *fabK*, *fabD*, *fabG*, *fabF*, *accB*, *fabZ*, *accC*, *accD* y *accA*. El gen *acpP* codifica ACP (Fig. 10). En este único operón, existen tres unidades transcripcionales diferentes. Una corresponde al gen *fabM*, otra corresponde a los genes *fabT-fabH-acpP* y otra corresponde a *fabK-fabD-fabG-accB-fabZ-accC-accD-accA* (Lu y Rock, 2006). El segundo gen en el operón (*fabT*) pertenece a la familia de MarR y actúa como un represor transcripcional del operón *fab*, con la excepción de *fabM*. La hiperexpresión del operón *fab* por la inactivación de FabT conduce a una deficiencia en

ácidos grasos insaturados y un incremento en la proporción de ácidos grasos de 18 carbonos. FabT se une a una secuencia palíndrome de DNA localizada en la región promotora de *fabT* y *fabK*, autorregulando su propia expresión (Lu y Rock, 2006) (Fig. 10). Similares operones se encuentran en otros grupos de bacterias gram positivas, como *Enterococcus*, *Clostridium* y *Lactococcus*. Todos estos operones contienen un gen homólogo al gen *fabT* en la misma posición dentro del operón y poseen una secuencia palindrómica similar, localizada en las regiones promotoras de las unidades transcripcionales de *fabT* y *fabK*, siendo la regulación de FabT similar en estas bacterias gram positivas. La proteína FabK es uno de los mayores determinantes de las propiedades físicas de la membrana de *S. pneumoniae*, que desvía intermediarios a la formación de ácidos grasos saturados (Lu y Rock, 2006).



**Figura 10. Biosíntesis de los ácidos grasos en *S. pneumoniae*.** Representación de la ruta biosintética de los ácidos grasos saturados e insaturados en *S. pneumoniae* (B) y operón de los genes implicados en la biosíntesis de los ácidos grasos (A). En distintos colores se encuentran las diferentes unidades transcripcionales que existen en el operón. Representados por una estrella se indica la localización de los palíndromos identificados en la región promotora de *fabT* y *fabK* a los que se une el represor transcripcional FabT.

FabM cataliza la conversión del trans-2 a cis-3-C10:1-ACP (Marrakchi et al., 2002), llevando a cabo la reacción de isomerización para la formación de ácidos grasos insaturados. El gen *fabM* es un gen esencial para el crecimiento y viabilidad en *S. pneumoniae*, siendo la única enzima responsable de la formación de ácidos grasos insaturados, no pudiendo ser éstos sustituidos por otros ácidos grasos sintetizados por el microorganismo. Este gen también es esencial en *S. mutans*, lo que indica que FabM es la única enzima implicada en la biosíntesis de ácidos grasos insaturados en el género *Streptococcus* (Altabe et al., 2007).

## 5. STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

*Streptococcus pneumoniae*, neumococo, es un miembro habitual de la microbiota del tracto nasofaríngeo humano (estado portador) y además es uno de los patógenos humanos gram positivos mas frecuentes (enfermedad invasiva). A principios del siglo XX, la neumonía neumocócica era una de las principales causas de muerte. En 1881, George Sternberg en Estados Unidos y Louis Pasteur en Francia, aislaron simultáneamente un microorganismo lanceolado, que se disponía en parejas, y que fue llamado *Diplococcus pneumoniae* (Pasteur, 1881; Sternberg, 1881). La capacidad de las nuevas técnicas de taxonomía bioquímicas y moleculares permitieron la clasificación de esta bacteria dentro del género *Streptococcus*, como *Streptococcus pneumoniae*. En 1882, Friedländer identificó al neumococo como el mayor causante de neumonía lobular en humanos.

El género *Streptococcus*, al que pertenece *S. pneumoniae*, está formado por cocos gram positivos, anaerobios facultativos, catalasa negativa y citocromo-oxidasa negativa. Los estreptococos clínicamente relevantes son homofermentativos siendo el producto final de la fermentación de la glucosa, el ácido láctico.

Los neumococos son bacterias de 0,5 a 1,25  $\mu\text{m}$  de longitud, que crecen en forma de cadenas o parejas. Son inmóviles, no forman endosporas, oxidasa negativos y constituyen un miembro  $\alpha$ -hemolítico del género *Streptococcus*. Sus múltiples auxotrofías lo convierten en un parásito obligado con complejos requerimientos nutricionales que coinciden en gran medida con los del ser humano (Tomasz y Hotchkiss, 1964), que es su único hospedador. Por esta razón, los medios de cultivo en los que crece son ricos en vitaminas y aminoácidos. Uno de los requerimientos

específicos es la colina, presente en los ácidos teicóicos y lipoteicóicos de su pared celular. El neumococo presenta  $\alpha$ - hemólisis cuando crece en un medio agar-sangre debido a la producción de neumolisina, que hidroliza la hemoglobina dando lugar a un pigmento verdoso. Contiene enzimas autolíticas, entre la que destaca la N-acetil-murámico-alanina amidasa (autolisina LytA), la cual rompe la unión entre el ácido murámico y la alanina del mucopéptido de la pared celular, durante la fase estacionaria del crecimiento. La lisis del neumococo por sales biliares ocurre a través de la activación de esta enzima, habiéndose introducido esta técnica en 1931 por Neufeld y R. Etinger-Tulczynska como un método de referencia para identificar *S. pneumoniae* (Neufeld y Etinger-Tulczynska, 1931). Una de las características fundamentales de *S. pneumoniae* es su cápsula polisacáridica, que juega un papel fundamental en la virulencia, de forma que la pérdida de cápsula en neumococo provoca una pérdida de virulencia. En la actualidad y basándose en las diferencias que existen en la estructura de ésta cápsula, se han identificado 90 serotipos (Henrichsen, 1995), frente a los que se desarrollan anticuerpos durante la infección.

Una de las principales características del neumococo es su capacidad natural de captación del DNA exógeno y posterior incorporación en el genoma bacteriano mediante el proceso de transformación cromosómica (Avery et al., 1995). La unión y transporte del DNA exógeno al citoplasma celular se produce de forma natural durante el estado de competencia, que se desarrolla en esta bacteria durante la fase exponencial del crecimiento. En 1995 Havarstein y cols. (Havarstein et al., 1995) demostraron que la molécula que induce el estado de competencia es un péptido que sintetiza y secreta *S. pneumoniae*, denominado CSP (de las siglas en ingles Competence-Stimulating Peptide). Este péptido, de 17 aminoácidos, resulta del procesamiento y transporte del producto del gen *comC*, siendo posteriormente secretado al exterior por parte del complejo de membrana ComAB. Cuando la concentración extracelular del péptido estimulador llega a un cierto umbral, el péptido activa el SDC ComDE, de forma que la unión del CSP extracelular con la HQ ComD induce su autofosforilación, transfiriendo el grupo fosfato al RR ComE, que actúa como inductor de la expresión de los operones *comCDE* y *comAB* (Ween et al., 1999). Además, la forma fosforilada de ComE activa la transcripción del gen *comX*, que codifica un factor sigma alternativo  $\sigma^x$  que dirige la transcripción de los genes específicos de la competencia (Claverys et al., 2006). Los productos de estos genes son enzimas implicadas en los procesos de adquisición del DNA exógeno (captación e internalización) y la recombinación entre dicho DNA y el

cromosoma. El control postranscripcional de ComX está mediado por ComW. Esta proteína tiene una doble función, la estabilización y la activación del factor  $\sigma^x$  (Sung y Morrison, 2005). La estimulación del CSP también está implicada en la formación de biopelículas bacterianas (biofilm) en las especies de *Streptococcus*, principalmente en las estirpes causantes de la placa dental (Suntharalingam y Cvitkovitch, 2005).

El genoma de *S. pneumoniae* está compuesto por un cromosoma único y circular, de un tamaño ligeramente superior a 2 Mpb, con un número estimado de genes que podría superar los 2000, aunque no se conoce el número exacto por existir más de 400 marcos abiertos de lectura (ORFs), con un tamaño inferior a 100 codones que podrían no ser genes reales. El contenido en G+C es del 40% en todas las cepas secuenciadas. Es notable la presencia de numerosas secuencias de inserción y transposasas que ocupan más del 3,5% del genoma. En la actualidad se han publicado las secuencias genómicas completas de cuatro cepas de *S. pneumoniae*: TIGR4 de serotipo 4 (Tettelin et al., 2001), la cepa de laboratorio R6 derivada de un serotipo 2 (Hoskins et al., 2001), G54, una cepa aislada clínicamente del serotipo 19F (Dopazo et al., 2001) y la estirpe D39, también del serotipo 2 (Lanie et al., 2007). También, están disponibles las secuencias completas de los genomas de otros siete *S. pneumoniae* pertenecientes a distintos serotipos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/genlist.cgi>). Finalmente, existen numerosos proyectos de secuenciación de genomas neumocócicos, que están actualmente en proceso de ejecución o ensamblaje (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/genlist.cgi>)

Este neumococo es uno de los patógenos humanos más importantes a escala mundial, causando una mortalidad infantil anual de 3 millones de casos (Greenwood, 1999). Es uno de los agentes etiológicos principales de neumonía lobular, meningitis, bacteriemia, otitis media y sinusitis, además de causar ocasionalmente otros síndromes como conjuntivitis, artritis séptica, osteomielitis (normalmente en vértebras), endocarditis, pericarditis y mastoiditis. Esta bacteria puede colonizar al individuo en su primer día de vida, formando parte de la flora comensal de su nasofaringe (Hjuler et al., 2007). Esta colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* puede ser origen de una posterior invasión, y en último término, puede llegar a causar enfermedad (Faden et al., 1990).

Bajo determinadas circunstancias, el neumococo puede desplazarse desde la nasofaringe a otros nichos ecológicos, pudiendo alcanzar los senos nasales y trompa de Eustaquio, causando sinusitis y otitis media. También puede alcanzar al pulmón,



causando neumonía lobular, una de las principales causas de mortalidad antes del descubrimiento de los antibióticos y que aún mantiene un 5% de mortalidad entre los pacientes. A través de roturas del epitelio de la nasofaringe o pulmonar puede alcanzar el torrente sanguíneo, provocando septicemia (Hosea et al., 1981). A través de la nasofaringe o a través del sistema circulatorio puede alcanzar las meninges, causando meningitis, siendo esta bacteria uno de los principales agentes causantes de meningitis en adultos. A pesar del empleo extendido de antibióticos y de los recientes programas de vacunación en países industrializados, las enfermedades neumocócicas todavía matan a varios millones de personas cada año, afectando sobre todo a determinados grupos de la población (niños, ancianos y personas inmunodeprimidas) (López et al., 2006).

El tratamiento habitual para este tipo de infecciones es la administración de penicilina, concretamente la penicilina G. Generalmente, la respuesta al antibiótico es rápida. Las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina (el primer antibiótico utilizado para tratar enfermedades causadas por esta bacteria) se describieron por primera vez a finales de la década de los años 60. Desde entonces, la incidencia de infecciones por neumococos resistentes a penicilina y otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos fue aumentando progresivamente. Durante el periodo entre 1980 y 1990, la resistencia del neumococo a múltiples agentes antibacterianos emergió de manera notoria.

La severidad del aumento de estirpes bacterianas resistentes puede verse reflejada en el aumento de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a los antibióticos comunes, lo que hace más complicado su tratamiento (Crook y Spratt, 1998). Afortunadamente, las infecciones de neumococos resistentes todavía pueden ser tratadas con fluoroquinolonas, oxazolidinonas y lincosamidas, aunque se recomienda el uso racional de estos antibióticos para que no se lleguen a alcanzar niveles elevados de resistencia a estas drogas (Appelbaum, 2002). En los casos de multi-resistencia, suele ser efectiva la administración de lincosamidas como la clindamicina (Giebink, 2001).

Ante el fracaso creciente de la terapia antimicrobiana frente al neumococo, debido al aumento en los niveles de resistencia, ha aumentado el interés por la vacunación, otra forma de control de la enfermedad neumocócica. Además, a diferencia de la vacunación, aunque los agentes antimicrobianos frente a neumococo consiguen tratar la enfermedad, dichos agentes no logran impedir su aparición. La primera vacuna basada en polisacáridos capsulares fue testada en 1960. Dicha vacuna estaba basada en una mezcla de polisacáridos de los 14 tipos capsulares causantes de la mayoría de las infecciones en 1977, lo que permitió la prevención del 78,5% de las infecciones

originadas por los tipos incluidos en las vacunas. Sin embargo como esta bacteria tiene una elevada capacidad de captar DNA exógeno y modificar su cápsula, fue necesario realizar una nueva formulación, que se desarrollo en 1983, en la que se expandió la formulación a 23 tipos capsulares, siendo ésta la vacuna mas compleja administrada a humanos (McGee, 2007). Pero estas vacunas no son eficaces satisfactoriamente, especialmente en el caso de ancianos y niños menores de 2 años, en los que la misma debilidad del sistema inmunológico que les predispone a la enfermedad dificulta su respuesta a la vacunación (Bentley, 1981). Con el objetivo de aumentar la inmunogenicidad, se están ensayando vacunas conjugadas con distintas proteínas, no solo polisacáridos. La primera vacuna conjugada para neumococo fue autorizada en el año 2000 e incluye polisacáridos capsulares de los 7 serotipos de los neumococo más virulentos involucrados en el 80% de los casos de enfermedad neumocócica invasiva (serotipos 4, 6B, 9V, 18C, 19F y 23F) junto a una variable no tóxica del toxoide de la difteria. La vacuna conjugada consigue aumentar significativamente los niveles de anticuerpos séricos protectores y disminuir tanto el porcentaje de niños portadores, como los casos de otitis media (Dagan et al., 1996). La eficacia de esta vacuna sigue estando muy lejos de los niveles exigibles, por lo que serán necesarios nuevos avances en el futuro (Eskola et al., 2001).

Conociendo todas las características que tiene *S. pneumoniae*, patógeno humano gram positivo con capacidad de captar DNA exógeno de forma natural, resistente a antibióticos, principal causante de enfermedades respiratorias y que actualmente se conozca el genoma completo de varias estirpes bacterianas, junto con la característica de que contiene un solo SDC esencial (YycFG), hacen a este microorganismo un sistema modelo idóneo para estudiar YycFG como diana potencial de interés para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos y por ello su SDC ha sido el objeto de estudio de este trabajo de tesis doctoral.

## **6. SISTEMAS DE EXPRESIÓN DE GENES ESENCIALES EN *S. pneumoniae***

Un paso fundamental en el descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos es la demostración de que la nueva actividad antibacteriana está relacionada con la inhibición de un gen o proteína específica (Payne et al., 2001). Los promotores inducibles han sido usados en el descubrimiento de agentes antimicrobianos, lo que ha

permitido caracterizar la función de genes esenciales y así se han podido desarrollar compuestos antimicrobianos contra los mismos (Apfel et al., 1999).

En *S. pneumoniae* sólo han sido estudiados un limitado número de promotores regulables. También han sido estudiados sistemas de promotores heterólogos derivados de los genes de la nisina (Bryan et al., 2000) o de la tetraciclina (Stieger et al., 1999) como herramienta para la regulación de la expresión de genes, pero su escaso rango de variación y sus elevados niveles basales hacen que su uso sea bastante limitado.

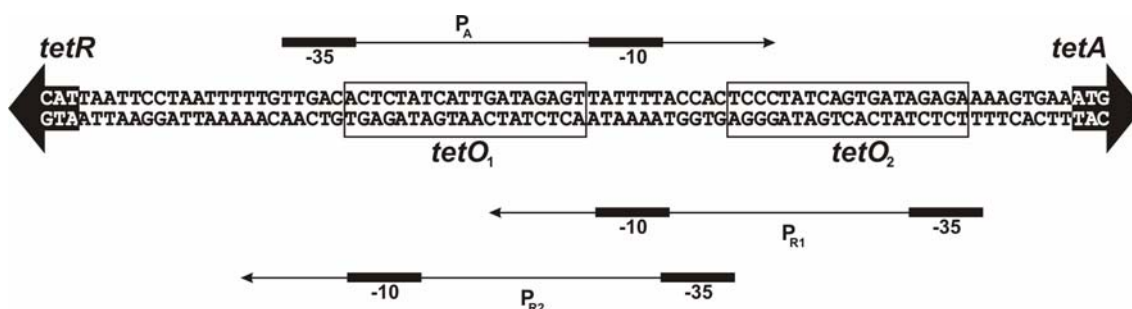
Por otra parte, en *S. pneumoniae* se han estudiado varios promotores neumocócicos asociados a genes implicados en el metabolismo de azúcares, ya que es conocido que la expresión de estos genes está regulada en muchas especies bacterianas. Recientemente se han detectado dos promotores regulables implicados en la utilización de carbohidratos. El promotor implicado en la regulación de la fucosa (Chan et al., 2003), cuya regulación se ha caracterizado, siendo inducible por fucosa y reprimible en presencia de sacarosa, aunque el papel de la fucosa en el metabolismo del neumococo no está claro, ya que las estirpes de *S. pneumoniae* testadas han sido incapaces de crecer en fucosa como única fuente de carbono. El otro promotor regulable identificado está implicado en el metabolismo de la rafinosa (Rosenow et al., 1999), aunque todavía no se ha demostrado su aplicación como promotor inducible.

Para la realización de este trabajo hemos utilizado el promotor neumocócico del operón *malMP* implicado en el metabolismo de la maltosa, que está caracterizado a nivel molecular y que es inducible en presencia de maltosa y reprimible en presencia de sacarosa en *S. pneumoniae* (Nieto et al., 2000).

## 6. 1. Sistema de expresión regulado por tetraciclina

El promotor regulado por tetraciclina y su represor, se describieron originalmente en el transposón *Tn10* de *E. coli* que se ha usado en multitud de sistemas de expresión diferentes (Lutz y Bujard, 1997; Nagahashi et al., 1997; Stieger et al., 1999). La estructura génica de este sistema está formada por el gen *tetA* que codifica una proteína de membrana y el gen *tetR* que se encuentra en orientación divergente a *tetA* y que codifica el represor transcripcional TetR (Hillen y Berens, 1994) (Fig. 11). En la región intergénica situada entre los genes *tetR* y *tetA* se encuentran tres promotores ( $P_A$ ,  $P_{R1}$  y  $P_{R2}$ ) y dos secuencias operadoras (*tetO<sub>1</sub>* y *tetO<sub>2</sub>*). TetR puede

unirse a ambas secuencias operadoras independientemente, de forma que cuando se une a la región *tetO*<sub>1</sub> inhibe la transcripción de *tetR* y *tetA*, mientras que cuando se une a la secuencia operadora *tetO*<sub>2</sub> reprime únicamente la transcripción del gen *tetR* (Meier et al., 1988). La afinidad de TetR por *tetO*<sub>2</sub> es dos veces superior que la de *tetO*<sub>1</sub> (Grkovic et al., 2002).



**Figura 11. Secuencia de la región intergénica *tetR-tetA* del *Tn10* en *E. coli*.** Esta región intergénica contiene dos secuencias de unión, denominadas *tetO*<sub>1</sub> y *tetO*<sub>2</sub>, que se encuentran remarcadas. Con flechas negras se indican el codón de iniciación de *tetR* y *tetA*. Los tres promotores que existen en esta zona están representados por flechas con la región -35 y -10 representadas por cajas negras. Adaptado de Chalmers y cols. (Chalmers et al., 2000).

En este sistema, el represor TetR bloquea la transcripción de los genes de resistencia a tetraciclina contenidos en el operón. Así en ausencia de tetraciclina, TetR se encuentra unido a sus 2 operadores localizados dentro de la región promotora del operón, impidiendo la transcripción. En presencia de tetraciclina, TetR sufre un cambio conformacional, impidiendo así su unión al operador y permitiendo la transcripción.

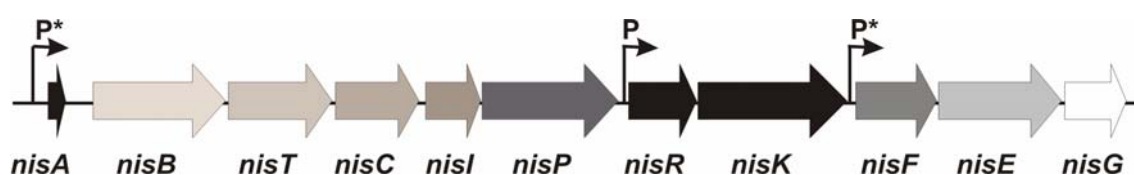
Las primeras utilizaciones del sistema de expresión controlado por tetraciclina ocurrieron en bacterias gram negativas (de la Torre et al., 1984), donde se desarrolló un promotor sintético sensible a tetraciclina, denominado  $P_{LtetO-1}$ , compuesto por el promotor  $P_L$  del bacteriófago  $\lambda$  en el que se remplazaron los sitios de unión del represor cI por las 2 secuencias operadoras *tetO* (Lutz y Bujard, 1997). Este sistema regulatorio posee un margen de inducción de unas 5000 veces usando anhidrotetraciclina como inductor.

Para su utilización en bacterias gram positivas se utilizó el promotor *xylA* de *B. subtilis* equipado con una o dos secuencias operadoras *tetO* y el gen *tetR* en posición divergente, obteniendo así el sistema  $P_{xyl/tet}$  utilizado tanto en *B. subtilis* (Geissendorfer y Hillen, 1990), como en *S. aureus* (Zhang et al., 2000) o en *S. mutans* (Wang y Kuramitsu, 2005).

En *S. pneumoniae* además de este sistema  $P_{xyl/tet}$ , se han desarrollado otros dos sistemas (Stieger et al., 1999), en los que se utilizó el promotor regulable por tetraciclina P57 y el gen represor *tetR* controlados por un promotor sintético constitutivo de *Streptococcus*. En uno de los sistemas se optimizó la región -35 del promotor regulable P57, obteniendo así una mayor regulación. Este sistema se ha utilizado para ajustar el nivel de expresión del RR huérfano RitR en *S. pneumoniae* (Ulijasz et al., 2004).

## 6. 2. Sistema de expresión regulado por nisina

Este sistema de expresión está basado en las propiedades autorreguladoras de la biosíntesis de la nisina en *L. lactis* (Kuipers et al., 1995b). La biosíntesis de la nisina está altamente regulada por un SDC, compuesto por el RR NisR (Van der Meer et al., 1993) y la proteína HQ sensora, NisK (Engelke et al., 1994). Cuando existe nisina en el medio extracelular, ésta es detectada por NisK que se autofosforila, transfiriendo posteriormente el grupo fosfato a NisR, que activa la transcripción de los genes que se encuentran bajo el promotor de *nisA* y *nisF* (de Ruyter et al., 1996) (Fig. 12). La expresión de *nisR* y *nisK* está dirigida por el promotor constitutivo de *nisR* (Kuipers et al., 1995a).



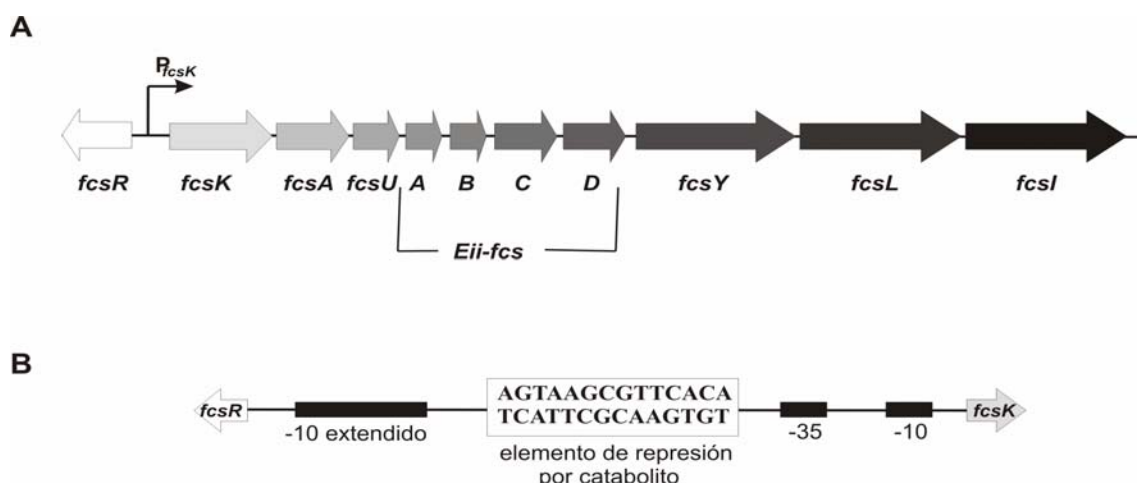
**Figura 12. Organización genética del operón de la biosíntesis de nisina en *L. lactis*.** Los promotores que se encuentran en la zona están representados por flechas y con un asterisco se encuentran señalados los promotores inducibles por nisina. Existen tres unidades transcripcionales distintas que componen este operón: la primera unidad transcripcional comprende el gen estructural *nisA*, los genes que codifican para la biosíntesis y secreción de nisina *nisBTC* y el gen inmunitario *nisI*, la segunda unidad transcripcional comprende los genes reguladores *nisRK* y la tercera unidad transcripcional contiene los genes inmunitarios *nisFEG*.

Basándose en este sistema, se han desarrollado plásmidos en los que se ha introducido el promotor del gen *nisA* y los genes reguladores *nisR* y *nisK* bajo un promotor constitutivo, permitiendo este sistema un eficiente control de la expresión de genes por nisina en una gran variedad de bacterias gram positivas como bacterias ácido

lácticas (Kleerebezem et al., 1997; Kuipers et al., 1997) y en algunas bacterias del género *Streptococcus* como *S. pneumoniae* (Eichenbaum et al., 1998), permitiendo en éste último una inducción de unas 59 veces.

### 6. 3. Sistema de expresión regulado por fucosa

Este sistema de expresión está basado en el catabolismo de la fucosa como carbohidrato. Los genes implicado en este catabolismo se encuentran organizados en un operón que contiene 11 genes, algunos de los cuales presentan homología con los genes del catabolismo de la fucosa en *E. coli* y *Haemophilus influenzae* (Elsinghorst y Mortlock, 1994; Fleischmann et al., 1995) (Fig. 13). El primer gen *fcsK* codifica una fuculoquinasa y divergente a él se encuentra el gen *fcsR* que codifica un posible gen regulador que posee un 35 % de similitud al represor transcripcional de la lactosa LacR de *S. mutans* (Rosey y Stewart, 1992), lo que sugiere una regulación negativa del operón de la fucosa. En la región intergénica situada entre estos dos genes se encuentra un promotor que contiene una secuencia palindrómica similar a la secuencia consenso del elemento de represión catabólica en *B. subtilis* (Hueck et al., 1994), lo que indica que el operón de la fucosa está sujeto a represión catabólica (Fig. 13). Esta organización del operón de la fucosa está conservada en los genomas de las estirpes de *S. pneumoniae* que se encuentran publicados hasta el momento.



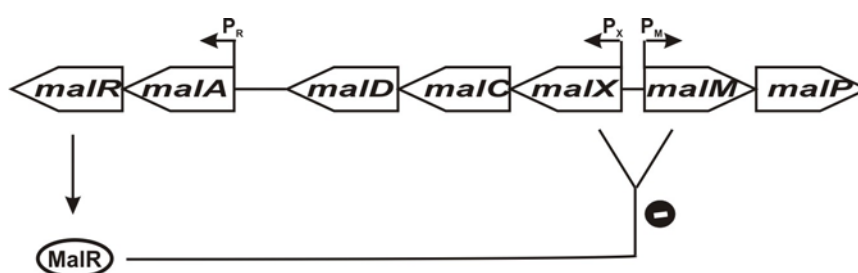
**Figura 13. Organización genética del operón de la fucosa y representación de su promotor ( $P_{fcsK}$ ) de *S. pneumoniae*.** (A) El operón de la fucosa está compuesto por 11 genes representados por flechas. El promotor está indicado y representado (B) indicando las regiones -35 y -10 de los promotores y la secuencia palindrómica similar al elemento de represión por catabolito de *B. subtilis*. Eii-fcs son componentes del sistema fosfoenolpiruvato y fosfotransferasa de captación de azúcares.

En *S. pneumoniae* se ha utilizado este promotor  $P_{fcsK}$  para testar la esencialidad de algunos genes, sustituyendo el promotor del gen por el promotor  $P_{fcsK}$  (Chan et al., 2003). La máxima inducción a partir de este promotor es de unas 300 veces y se observó en un medio conteniendo  $> 0,4 \%$  de fucosa como azúcar inductor en presencia de  $0,3 \%$  de sacarosa, ya que *S. pneumoniae* es incapaz de crecer con fucosa como única fuente de carbono. La represión a partir de este promotor es de unas 25 veces en presencia de concentraciones crecientes de sacarosa.

#### 6. 4. Sistema de expresión regulado por maltosa

*S. pneumoniae* utiliza como metabolismo energético necesario para el crecimiento y división celular, la fermentación de carbohidratos, que son oxidados a piruvato a través de la ruta de la glicólisis (Holt et al., 1994). Los azúcares que esta bacteria es capaz de utilizar como fuente de energía son fructosa, galactosa, sacarosa, glucosa, rafinosa, lactosa, trehalosa, inulina y maltosa. El único sistema de transporte de azúcar caracterizado en *S. pneumoniae* es el sistema de utilización de los maltosacáridos (Stassi et al., 1982).

Los genes implicados en el transporte y utilización de maltosacáridos en *S. pneumoniae* están organizados en tres operones (Fig. 14).

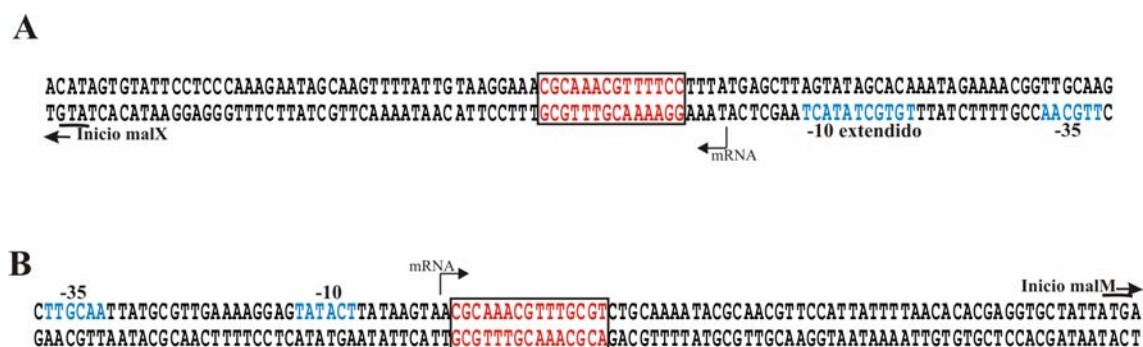


**Figura 14. Organización del regulón de la maltosa de *S. pneumoniae*.** Esquemática representación de la región, indicando los promotores  $P_X$ ,  $P_M$  y  $P_R$ . Los promotores  $P_X$  y  $P_M$  transcriben en orientación opuesta. También se encuentra indicado el control regulatorio negativo de MalR sobre el promotor  $P_X$  y  $P_M$ .

Dos de estos operones son *malXCD*, cuyos productos están implicados en la captación de maltosacáridos y *malMP*, que codifican las enzimas implicadas en el metabolismo de maltosacáridos. Estos dos operones se transcriben a partir de dos

promotores divergentes,  $P_X$  y  $P_M$ , y están regulados negativamente por el represor transcripcional MalR.

El gen *malR* codifica un represor transcripcional perteneciente a la familia LacI-GalR. En un principio se observó que mutaciones en este gen provocaban una expresión constitutiva de la proteína MalM, denotando que MalR está implicado en la represión de MalM (Puyet y Espinosa, 1993). Posteriormente se demostró que MalR se une a dos regiones ligeramente diferentes situadas en la región intergénica entre los operones *malXCD* y *malMP* (Nieto et al., 1997), siendo esta secuencia consenso similar a la secuencia operadora a la que se une el represor PurR de *E. coli* (Rolfes y Zalkin, 1988)(Fig. 15).



**Figura 15. Región promotora de los operones *malXCD* y *malMP*.** Región del promotor  $P_X$  (A) y  $P_M$  (B) incluyendo sus regiones -35 y -10 y subrayado el codón de iniciación de los genes *malX* y *malM*. La secuencia consenso a la que se une la proteína MalR aparece en rojo. El sitio de inicio de la transcripción está indicado por una flecha.

En ausencia de maltosa, MalR se une a estas secuencias operadoras. Sin embargo, en presencia de maltosa, no se produce dicha unión (Nieto et al., 1997), habiéndose propuesto que la maltosa al unirse a MalR induce un cambio conformacional transitorio de la proteína de forma activa a forma inactiva (Nieto et al., 1997), como ocurre con LacI (Lewis et al., 1996).

Se han encontrado diferencias en la capacidad de unión de MalR por las secuencias operadoras de *malXCD* y *malMP*, observando que MalR presenta mayor afinidad por la secuencia operadora de *malMP* que por la de *malXCD*. Esto puede ser debido a las pequeñas diferencias que existen en las secuencias operadoras, más concretamente en las bases adyacentes de la simetría GC, que al no ser totalmente palindrómicas en el operador de *malXCD*, podrían provocar una reducción de la



afinidad de MalR por este operador (Nieto et al., 1997). También se han detectado diferencias en la capacidad de unión de la RNA polimerasa a las secuencias de reconocimiento de los promotores  $P_X$  y  $P_M$ , habiéndose detectando una mayor afinidad por las secuencias de reconocimiento del promotor  $P_X$  (Nieto et al., 2001). Por esto se ha llegando a la conclusión que MalR reprime la transcripción desde el promotor  $P_M$  por la unión de éste a la secuencia operadora de *malMP*, impidiendo la unión de la RNA polimerasa a este operador, al competir ambas proteínas por la misma región de DNA. La competición entre MalR y la RNA polimerasa es más evidente en el operón *malMP* que en el *malXCD*, debido a que la RNA polimerasa tiene mayor afinidad por el operador *malXCD*.

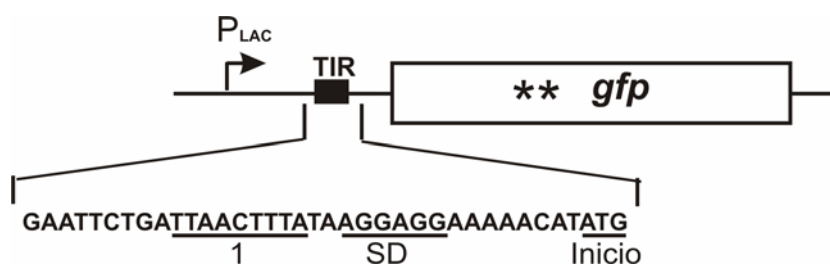
Por lo tanto, el operón *malMP*, implicado en el metabolismo de maltodextrinas, debe estar inhibido en ausencia de inductor, mientras que *malXCD*, implicado en los procesos de captación, debe funcionar, al menos a niveles basales, en todas las condiciones de crecimiento, permitiendo así una entrada basal de las moléculas de maltosa y maltodextrinas que permitan la activación del sistema.

En nuestro laboratorio, y en colaboración con el laboratorio del Dr. Manuel Espinosa, se han desarrollado una familia de plásmidos, basados en el plásmido natural del género *Streptococcus* pMV158 (Burdett, 1980), que contienen una versión modificada del gen *gfp* de la medusa *Aequorea victoria*, que codifica una variante de la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el control del promotor  $P_M$ .

La proteína GFP se ha utilizado como marcador para el estudio de la expresión y regulación tanto en organismos procariotas como eucariotas. Su capacidad de fluorescencia en ausencia de cofactores hace de esta proteína una herramienta muy adecuada para los estudios *in situ*. Sin embargo, el primer vector disponible que contenía la GFP (Clontech, Palo Alto, CA) no era adecuado para su uso en procariotas. Para que las bacterias expresaran *gfp* era necesario un promotor fuerte, como el promotor *lac*, mientras que en presencia de promotores débiles, la fluorescencia no era detectable. Para incrementar los niveles de fluorescencia, se introdujeron mutaciones en el gen *gfp*. Una de ellas consistió en la sustitución de la Serina 65 de la GFP por Treonina, que provoca un incremento en la fluorescencia y un desplazamiento del máximo de excitación hacia el rojo (de 395nm a aproximadamente 490nm) (Heim et al., 1995). Otra de las mutaciones que se realizó produjo el cambio de la Fenilalanina 64 de la GFP por Leucina, la cual incrementa la solubilidad de la proteína por cambios en el

plegamiento de la proteína, lo que implica que la fluorescencia aumente unas 45 veces respecto a la proteína silvestre (Cormack et al., 1996).

Con el gen *gfp* conteniendo las 2 mutaciones anteriormente descritas se creó el plásmido pGreenTIR (Miller y Lindow, 1997). Este plásmido es una variante del plásmido pUC1813 que contiene el promotor de *lacZ* ( $P_{lac}$ ) junto con una región de iniciación a la traducción optimizada (Translation Initiation Region, TIR) delante del gen *gfp* (Cheng y Patterson, 1992). Esta TIR está formada por una región que contiene una secuencia de Shine-Dalgarno (SD) consenso, junto con una secuencia espaciadora que minimiza la estructura secundaria del RNA, y una secuencia específica del gen  $\phi 10$  del bacteriófago T7, que aumenta la eficiencia de traducción (Fig. 16). Las células procariotas que contienen este TIR-*gfp* presentan una fluorescencia de 40 a 80 veces superior a la de las células que contienen el gen *gfp* sin la región TIR.



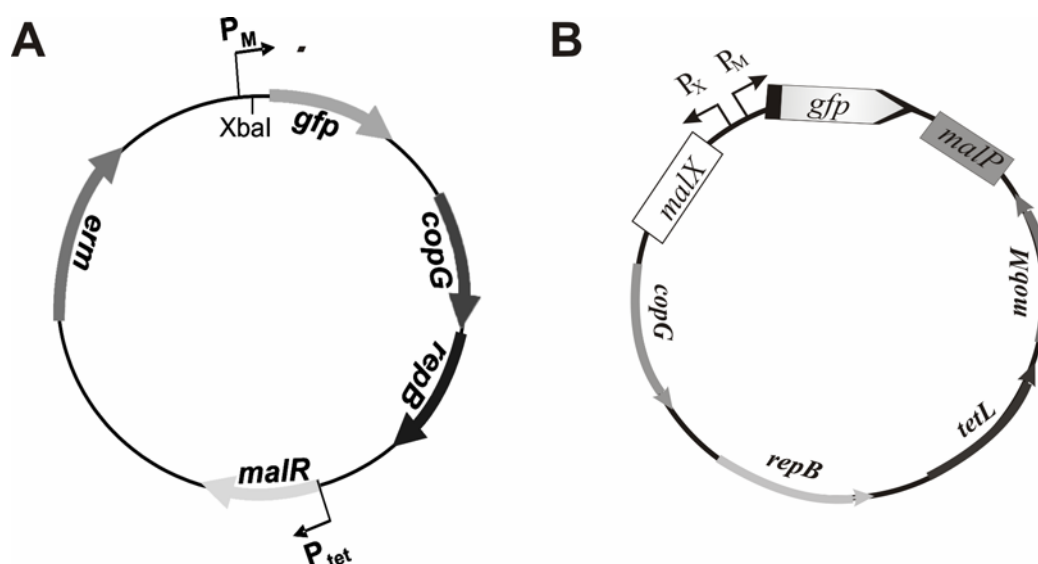
**Figura 16. Diagrama de la región del gen *gfp* en el plásmido pGreenTIR.** Región del plásmido pGreenTIR que contiene la región promotora del gen *gfp* mutado. La doble mutación F64L/S65T que se realizó en el gen *gfp* se encuentra representada por dos asteriscos (\*). La región TIR está compuesta por: SD, región Shine-Dalgarno, 1, región del gen  $\phi 10$  del bacteriófago T7 que aumenta la traducción y el codón de inicio de la transcripción. El promotor que controla la iniciación de la transcripción es el promotor *lac* ( $P_{LAC}$ ).

El primer plásmido que permitió la expresión de la proteína GFP en *S. pneumoniae* fue pLS70GFP (Acebo et al., 2000). Este plásmido recombinante es un derivado del plásmido pLS70 (Stassi et al., 1981) en el cual se clonó la región que contiene el gen modificado *gfp* procedente del plásmido pGreenTIR (Miller y Lindow, 1997) bajo el control del promotor neumocócico  $P_M$ , que como se ha detallado previamente es un promotor inducible por maltosa y regulado por el represor transcripcional MalR (Nieto et al., 1997).

La medida de la actividad de la GFP requiere oxidación post-traducciona de la proteína y su total actividad se produce a valores de pH próximos a 7 (Sullivan y Kay,

1999). Estos requerimientos han dificultado el empleo de la GFP como una herramienta útil para los neumococos, no detectándose fluorescencia en las colonias de *S. pneumoniae* debido a sus características de bacteria acidófila y microaerófila. Sin embargo, con estirpes de *S. pneumoniae* portadoras de pLS70GFP se estandarizaron las condiciones de detección de la GFP por espectroscopía y microscopía de fluorescencia, exponiendo a las células a condiciones aeróbicas y a pH neutro (Acebo et al. 2000). También se determinó, que la expresión de la GFP a partir del promotor  $P_M$  pLS70GFP era inducible o constitutiva, respectivamente, en la estirpes de *S. pneumoniae* silvestre o deficiente en MalR (Acebo et al., 2000).

La construcción de los plásmidos pLS1RGFP (Nieto et al., 2000) (Fig. 17A) y pLS1GFP (Fernández de Palencia et al., 2000) (Fig. 17B) permitió analizar comparativamente en *S. pneumoniae* el efecto de MalR sobre la expresión de la fusión  $P_M$ -gfp suplementando el gen *malR* en multicopia (codificado por el mismo plásmido) o en monocopia (codificado por el cromosoma) (Nieto et al., 2000). Ambos plásmidos están basados en el vector pLS1 (Lacks et al., 1986), un derivado del replicón pMV158 de *Streptococcus agalactiae* (Burdett, 1980).



**Figura 17. Mapa físico de los plásmidos pLS1RGFP y pLS1GFP.** Representación de los plásmidos pLS1RGFP (A) y pLS1GFP (B). Los genes codificados en los plásmidos se representan por flechas que indican la dirección de la transcripción. Los genes más relevantes, *malR* y *gfp*, están representados por flechas. Los promotores  $P_M$  y  $P_{tet}$  indican la dirección de la transcripción.

Al analizar la síntesis de GFP en células de *S. pneumoniae* que contienen los plásmidos pLS1RGFP o pLS1GFP, se observó que, en ambos casos la expresión de la GFP era inducible. En las células portadoras del pLS1GFP la proteína GFP fue sintetizada tanto en condiciones de represión (crecimiento en presencia de sacarosa) como de inducción (crecimiento en presencia de maltosa), observándose un incremento neto de 3 a 7 veces cuando las células se crecen en presencia de sacarosa y maltosa o sólo maltosa. En las células portadoras del plásmido pLS1RGFP se observó una regulación mayor de la síntesis de la GFP, detectándose tan sólo niveles basales de la GFP cuando las células se encontraban en un medio con sacarosa como única fuente de carbono y una correlación entre los incrementos de la expresión de la GFP y la concentración de la maltosa en un rango de 0,1 mM a 25 mM. (Nieto et al., 2000). Estos resultados mostraron que el plásmido pLS1RGFP es un vector neumocócico altamente regulado, que podría ser utilizado para expresar genes. Durante el desarrollo de esta tesis ha sido validada esta hipótesis al utilizarse para expresar el sistema YycFG. Posteriormente a nuestra utilización se ha empleado para expresar el SDC06 de *S. pneumoniae* (Standish et al., 2007).

El plásmido pLS1GFP fue transferido a *L. lactis* ((Gasson, 1983), al igual que el plásmido pLS1RGFP (Viegas et al., 2004). El análisis de las células portadores reveló que la expresión de la GFP a partir de pLS1GFP era constitutiva (Fernández de Palencia et al., 2000), mientras que a partir de pLS1RGFP era inducible (Viegas et al., 2004) demostrando así que la proteína GFP puede ser utilizada como marcador para la expresión génica y que el plásmido pLS1RGFP es un posible vector para regular la expresión de genes en bacterias lácticas. Estos plásmidos mencionados anteriormente, al ser movilizables, se transfieren por electroporación, técnica que a veces no funciona cuando se utilizan estirpes silvestres.

Posteriormente, se construyó el plásmido pMV158GFP un plásmido movilizable basado en el plásmido pMV158 y que también contiene la fusión  $P_M$ -gfp (Nieto y Espinosa, 2003). El plásmido pMV158 y sus derivados que contienen el origen de transferencia oriT y el gen *mobM*, cuyo producto actúa sobre oriT, son movilizables por conjugación en bacterias gram positivas y gram negativas (Priebe y Lacks, 1989; Van der Lelie et al., 1990; Farias y Espinosa, 2000). Este hecho ha permitido la transferencia conjugativa de pMV158GFP por movilización tanto homoespecífica como intergenérica desde *S. pneumoniae* a bacterias ácido lácticas como *Enterococcus faecalis* (Nieto y Espinosa, 2003) y *L. lactis* (Fernández de Palencia et al.,

2004). Así, todas las bacterias portadoras del plásmido pMV158GFP muestran fluorescencia de forma constitutiva y pueden ser utilizadas para realizar estudios de colonización, como la estirpe de *L. lactis* portadora de pMV158GFP que ha sido utilizada para detectar dicha bacteria durante la elaboración de queso (Fernández de Palencia et al., 2004). Junto con la construcción de este plásmido se desarrolló un método de transferencia por movilización conjugativa entre *S. pneumoniae* y *L. lactis* sin marcador seleccionable, siendo éste un posible método de selección directa en estirpes silvestres de interés industrial (Fernández de Palencia et al., 2004).



## **OBJETIVOS**





Esta Tesis doctoral se planteó con el objetivo de caracterizar la función reguladora del sistema de dos componentes YycFG específico de bacterias gram positivas, utilizando como sistema modelo *S. pneumoniae*.

Antes de comenzar este trabajo se había demostrado que YycFG es el único sistema de dos componentes esencial en *S. pneumoniae*, *B. subtilis* y *S. aureus*. Además, se sabía que en *S. pneumoniae* sólo el regulador de respuesta YycF es esencial, mientras que en las otras dos bacterias tanto el regulador como la histidina kinasa YycG eran esenciales.

Basandonos en dichos conocimientos abordamos los siguientes objetivos específicos para intentar alcanzar el objetivo global:

- Estandarización del sistema de sobreexpresión del SDC basado en el plásmido pLS1RGFP. Este sistema de sobreexpresión permite analizar *in vivo* la función de proteínas esenciales.
- Estandarización y utilización de un análisis transcriptómico global empleando un nuevo microarray que contiene 2353 genes del genoma de *S. pneumoniae*.
- Estandarización y utilización de un análisis proteómico global de *S. pneumoniae* empleando geles 2D y análisis de MALDI-TOF de los digeridos trópticos.
- Validación de los análisis genómicos y proteómicos globales mediante estudios de interacción proteína-DNA, RT-PCR y transcripción *in vitro*.
- Estudios de la influencia de YycFG en la composición de los ácidos grasos de membrana de *S. pneumoniae* mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas y cromatografía en capa fina.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## MATERIALES

### 1. MATERIAL BIOLÓGICO: ESTIRPES BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS

#### 1. 1. Estirpes bacterianas

Las estirpes bacterianas utilizadas en esta tesis, así como sus características genotípicas y su procedencia, se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Estirpes bacterianas**

Estirpe bacteriana	Genotipo	Referencia
<i>S. pneumoniae</i> 708	<i>end-1 exo-1 trt-1 hex-4 malM594</i>	(Lacks, 1970)
<i>S. pneumoniae</i> R61	Derivado no capsulado de la estirpe D39 (serotipo 2)	(Hoskins et al., 2001)
<i>S. pneumoniae</i> JNR7/87 (TIGR4)	Estirpe capsulada de serotipo 4.	(Bricker y Camilli, 1999)
<i>S. pneumoniae</i> JNR7/87 <i>yycG::kan</i>	Derivado de la estirpe JNR7/87 en el que se ha producido una interrupción del gen <i>yycG</i> mediante la inserción de un gen que confiere resistencia a kanamicina.	(Sung et al., 2001)
<i>L. lactis</i> MG1363	Estirpe derivada de <i>L. lactis</i> 712, Lac <sup>-</sup> , Cit <sup>-</sup> , Rec <sup>+</sup> , carente de plásmidos.	(Gasson, 1983)
<i>E. coli</i> M15[pREP4]	Estirpe derivada de <i>E. coli</i> K12 que contiene el pREP4, el cual confiere resistencia a Km y expresa constitutivamente el represor lacI	Qiagen
<i>E. coli</i> REG-1	Estirpe de <i>E. coli</i> que contiene el elemento regulador <i>nahR/Psal::xylS2</i> integrado en el cromosoma.	Biomedal

#### 1. 2. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo, así como los construidos durante el desarrollo del mismo se detallan a continuación en la Tabla 2.

**Tabla 2. Plásmidos**

Plásmido	Tamaño (pb)	Marcador	Características	Referencia
pLS1RGFP	9.400	Em <sup>R</sup>	Vector de expresión inducible por maltosa, que contiene el gen <i>malR</i> y el gen que codifica la proteína fluorescente verde.	(Nieto et al., 2000)

pRR	10.165	Em <sup>R</sup>	Clonaje del fragmento RR en el sitio XbaI del plásmido pLS1RGFP en la orientación del promotor P <sub>M</sub>	Este trabajo
pRRHK	11.515	Em <sup>R</sup>	Clonaje del fragmento RRHK en el sitio XbaI del plásmido pLS1RGFP en la orientación del promotor P <sub>M</sub>	Este trabajo
pQE30	3.460	Amp <sup>R</sup>	Vector de clonaje y expresión utilizado para generar proteínas con la etiqueta His <sub>6</sub> en su extremo amino	Qiagen
pQE30RR	4.260	Amp <sup>R</sup>	Construcción que contiene el marco de lectura del gen <i>YycF</i> de <i>S. pneumoniae</i> , para generar la proteína YycF que contiene la etiqueta His <sub>6</sub> en su extremo amino.	Este trabajo
pALEX	4.000	Amp <sup>R</sup>	Vector de clonaje y expresión utilizado para generar proteínas con el extremo 3' del gen <i>lytA</i> de <i>S. pneumoniae</i> en el extremo amino de la proteína.	Biomedal
pALEXRR	4.800	Amp <sup>R</sup>	Construcción que contiene el marco de lectura del gen <i>YycF</i> de <i>S. pneumoniae</i> para generar la proteína YycF que contiene en el extremo amino el extremo 3' del gen <i>lytA</i> de <i>S. pneumoniae</i> .	Este trabajo

## 2. MEDIOS DE CULTIVO

### 2. 1. Medio de cultivo para *S. pneumoniae*.

Para el crecimiento de *S. pneumoniae* en medio líquido se utilizó el AGCH, basado en un hidrolizado de caseína (Lacks, 1966), suplementado con un 0,2% de extracto de levadura (AGCHY), y con sacarosa y/o maltosa en las concentraciones indicadas en el capítulo de Resultados. Para el crecimiento en medio sólido, las células se mezclaron con una capa basal de AGCHY + agar al 1% y antibiótico, a la cual se le agregó una fina capa superficial (AGCHY + agar al 0,75%) para crear las condiciones de baja oxigenación requeridas por la estirpe. Se añadieron los siguientes antibióticos a las concentraciones finales indicadas: eritromicina (Em) 1 µg/ml y Kanamicina (Km) 250 µg/ml.

Para el análisis de ácidos grasos de membrana y el marcaje de proteínas *in vivo* los cultivos se crecieron en medio NOCH, que es un medio AGCH modificado en el que los casaminoácidos libres de vitaminas han sido reemplazados por los siguientes aminoácidos, a una concentración de 50 µg/ml: Isoleucina, Histidina, Arginina,

Treonina, Fenilalanina, Tiroxina, Triptófano, Glicina, Serina, Prolina, Glutámico, Aspártico, Alanina, Valina, Lisina, Metionina y Leucina. El hidrolizado de caseína y la albúmina fueron reducidos, respectivamente, a 0.05 y 0.01%. Esta modificación fue requerida para minimizar la incorporación de ácidos grasos presentes en el medio en la membrana neumococal.

## **2. 2. Medio de cultivo para *E. coli*.**

Las estirpes de *E. coli* en cultivo líquido se crecieron en el medio rico TY 2X (Sambrook et al., 1989b) y para el crecimiento en placa se añadió al medio agar al 1,5%, siendo el crecimiento de los cultivos de *E. coli* en superficie. Se utilizó el medio SOC (medio SOB (Hanahan, 1983) complementado con 20 mM de glucosa) tanto para la preparación de células electroporables como para la expresión en líquido después de la electroporación y antes de la selección de los transformantes en medio sólido. Se añadieron los siguientes antibióticos a las concentraciones finales indicadas: ampicilina (Amp) 100 µg/ml y kanamicina (Km) 25 µg/ml.

## **2. 3. Medio de cultivo par *L. lactis*.**

Para el crecimiento de *L. lactis* en medio líquido se utilizó el medio M17 (Terzaghi y Sandine, 1975) suplementado con 1% de glucosa ( M17G). El crecimiento en medio sólido se realizó adicionando agar al 1,5% al medio M17G. Cuando fue necesaria la selección de marcadores plasmídicos se añadió como antibiótico la eritromicina (Em) a la concentración final de 5 µg/ml.

# **3. FRAGMENTOS DE DNA Y OLIGONUCLEÓTIDOS**

## **3. 1. Oligonucleótidos**

Todos los oligonucleótidos empleados en este trabajo han sido sintetizados y purificados por HPLC, usando una columna Vydac C-18 (The Separation Group) en el

servicio de Química de Proteínas del CIB. La concentración de los oligonucleótidos se determinó midiendo en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-2401 PC) la absorbancia a 258 nm y considerando la relación  $A_{258}$ /concentración proporcionada por el programa OLIGO 3.4 de MedProbe.

El nombre de los oligonucleótidos utilizados, así como su secuencia y otras características relevantes, se describen en la Tabla 3.

**Tabla 3. Oligonucleótidos**

Nombre	Tamaño (pb)	Secuencia 5'-3'	Utilización
rrNheI	30	TTTGGTATAATAGCTAGCAAAAAGGTGAAC	PCR
hkNheI	30	AAAATACTGTATTGCTAGCCTATTTCACTC	PCR
rrXbaI	32	CTGGTAAAAATGGTCTAGATCAGTAAATCAAG	PCR
VicXup	30	TTTAGCGTCGGGTCCAGTGGAATTCCTT	PCR
VicXdown	29	TCTCTGTCAATGGTGTTCGGTATCTGGT	PCR
RRup	29	TAGAGCAATTTGAAGCAGAGCAACCAGAT	PCR
Hkrev	29	ATAAGGGAGTACAATGGTAAAGGTTGAAC	PCR
WN259	24	AGTCTATAGCTTGGTACCGACGAT	PCR
WN212	25	AGAAACCATTACTGTACTTAATAAA	PCR
RRbinding up	23	TACCCACTTGCCAAACCCCAACA	PCR
RRbinding low	23	TTGCTCTAGCGCTTCACGACCAT	PCR
RRup BamHI	35	TTTGGTATAATAGTAGAGAAAAAGGATCCCATATG	PCR
RRdown HindIII	32	AATAAGAGGGTCACAACAAGCTTGAAACCTAA	PCR
FabTUpper	28	CATTCGGAGAGAAGAAGACCTAAATTTA	PCR
FabTLower	32	CCTCAATTACAAGGACATTGTTAAATATAGAT	PCR
Px1	21	GTGTAACAGTTCCAAGCACCG	PCR
Px2	21	CCCTAATCTTGGTCCCTCCAT	PCR

### 3. 2. Fragmentos de DNA

En la Tabla 4 se muestran los fragmentos de DNA utilizados en esta tesis, así como sus características y utilización.

**Tabla 4. Fragmentos de DNA**

Nombre	Tamaño (pb)	Obtención	Características	Procedencia	Utilización
RR	765	Por PCR de DNA cromosómico con los oligonucleótidos rrNheI y rrXbaI	Fragmento que contiene el gen <i>yycF</i>	Este trabajo	Clonaje del gen <i>yycF</i> en el vector de expresión pLS1RGFP
RRHK	2115	Por PCR de DNA	Fragmento que	Este trabajo	Clonaje de los



		cromosómico con los oligonucleótidos rrNheI y hkNheI	contiene los genes <i>yycF</i> y <i>yycG</i>		genes <i>yycF</i> e <i>yycG</i> en el vector de expresión pLS1RGFP
yycF-800	800	Por PCR de DNA cromosómico con los oligonucleótidos RRup BamHI y RRdown HindIII	Fragmento que contiene el marco de lectura del gen <i>yycF</i> de <i>S. pneumoniae</i> . Los oligonucleótidos utilizados en la PCR añaden en cada extremo las secuencias diana BamHI e HindIII	Este trabajo	Clonaje en el vector pQE30 para la sobreproducción de His <sub>6</sub> -YycF y para el vector pAlexA para la sobreproducción del C-lytA-YycF.
SDC02bind	249	Por PCR de DNA cromosómico con los oligonucleótidos RRbinding up y RRbinding low	Fragmento que contiene la región promotora del operón TCS02	Este trabajo	EMSA
FabTbind	194	Por PCR de DNA cromosómico con los oligonucleótidos FabTUpper y FabTlower.	Fragmento que contiene la región promotora del gen <i>fabT</i>	Este trabajo	EMSA
PxSpn	318	Por PCR de DNA cromosómico con los oligonucleótidos Px1 y Px2	Fragmento que contiene el promotor Px del regulón de la maltosa de <i>S. pneumoniae</i>	Laboratorio	EMSA

#### 4. ENZIMAS

Las enzimas de restricción, la ligasa del fago T4 y la DNasa I de páncreas bovino fueron suministradas por las firmas comerciales New England Biolabs y Roche. Las DNA polimerasas utilizadas en la amplificación por PCR (*Taq*, DNAzyme y *Pfu*) fueron suministradas por Invitrogen, Fynzimes y Stratagen. De Promega se adquirió la transcriptasa reversa AMV y de Invitrogen, la transcriptasa reversa Thermoscript, la RNasaOUT y la RNasa H. La DNasa libre de proteasas fue suministrada por la casa Roche y otras enzimas utilizadas (RNasa A, lisozima y seroalbúmina bovina (BSA)) fueron suministradas por Sigma.

## 5. TAMPONES Y SOLUCIONES

Las soluciones y tampones utilizados en esta tesis se describen en la Tabla 5.

**Tabla 5. Soluciones y tampones utilizados**

Nombre	Composición	Aplicación
Tampón TE (10:1)	10 mM de Tris-HCl pH 8,0 1mM de EDTA	
Tampón PBS	10 mM de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 140 mM de NaCl 3 mM de KCl El pH resultante es pH 8,0	
Tampón TAE	40 mM de Tris base 20 mM de Ácido acético 2 mM de EDTA El pH resultante es 8,1	Electroforesis de DNA en geles de agarosa.
Tampón Electroforesis proteínas	25 mM de Tris base 190 mM Glicina SDS al 0,1%	Electroforesis de proteínas en geles PAA/SDS.
Colorante de carga SLB 5X	250 mM al Tris-HCl pH 8,8 SDS al 10% β-Mercaptoetanol al 25% Glicerol al 50% Azul de bromofenol al 0,5%	Tampón de carga para electroforesis de proteínas de PAA.
Colorante de carga SBE 3X	Sacarosa al 30% Azul de bromofenol al 0,075% 2,5 mM de EDTA	Tampón de carga para electroforesis de DNA.
Tampón E	20 mM de Tris-HCl pH 8,0 200 mM de NaCl 2 mM de EDTA pH 8	Elución de fragmentos de DNA de geles de PAA.
Tampón transferencia	50 mM de Tris base 190 mM de Glicina SDS al 1% Metanol al 20%	Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.
Tampón TBS	20 mM de Tris-HCl pH 7,5 500 mM de NaCl	Ensayos de hibridación de Western.
Tampón TTBS	20 mM de Tris-HCl pH 7,5 500 mM de NaCl Tween-20 al 0,1%	Ensayos de hibridación de Western.
Tampón 1	10 mM de SDS 200 mM de DTT 28 mM de Tris base 20 mM de Tris-HCl	Solución para los extractos de proteínas de geles bidimensionales.
Tampón 2	24 mM de Tris base 0,47 mM de Tris-HCl 50mM de MgCl <sub>2</sub> RNasa libre de proteasas 250 µg DNasa libre de proteasas 1 mg	Solución para los extractos de proteínas de geles bidimensionales.
Tampón de lisis IPG	7 M de Urea 2 M de Tiourea CHAPS al 4% 40 mM de Tris base	Solución para correr la primera dimensión de los geles bidimensionales.

Tampón de rehidratación	7 M de Urea 2 M de Tiourea CHAPS al 2% Tampón IPG pH 4 – 7 18,2 mM de DTT Azul de bromofenol	Solución para correr la primera dimensión de los geles bidimensionales.
Tampón de equilibrio	Tris-Acetato al 56% SDS al 5% 6 M de Urea Glicerol al 30%	Solución para los geles bidimensionales. Suplementado con 52 mM DTT forma el Tampón de equilibrio 1, y suplementado con 1,35 M de iodoacetamida forma el Tampón de equilibrio 2.
Tampón cátodo	200 mM de Tris base 200 mM de Tricina SDS al 0,4%	Electroforesis de proteínas de geles bidimensionales.
Tampón ánodo	26 mM de Tris base Ácido acético glacial al 0,085%	Electroforesis de proteínas de geles bidimensionales.
Solución de fijación	Metanol al 40% Ácido acético glacial al 10%	Solución de fijación del colorante Sypro Ruby.
Solución de destañido	Metanol al 10% Ácido acético glacial al 6%	Solución de destañido del colorante Sypro Ruby.
Tampón SSC	150 mM de NaCl 15 mM de Citrato sódico	Solución para microarrays.
Tampón de rotura	50 mM de Tris-HCl pH 6,8 SDS al 2% 2 mM de EDTA 143 mM de $\beta$ -Mercaptoetanol Glicerol al 10%	Solución para extractos totales de proteínas.
Tampón TBE	89 mM al Tris base 89 mM de Ácido bórico 2,5 mM de EDTA El pH resultante es 8,3	Electroforesis de DNA en geles de agarosa y poliacrilamida nativos.
Tampón IEF	7 M de Urea 2 M de Tiourea ASB 14 al 1% 40 mM de Tris base 2 mM de Tiobutil fosfina Anfolitos pH 3-10 al 0,5%	Electroforesis de proteínas de membrana de geles bidimensionales.

## 6. MATERIAL AUTORADIOGRÁFICO

Para la exposición de las muestras marcadas radiactivamente se utilizaron películas X-OMAT (Kodak) y pantallas amplificadoras Cronex Lightning-plus (Dupont). El análisis y la cuantificación de bandas radiactivas, tanto de [ $^{32}\text{P}$ ] como de [ $^{35}\text{S}$ ], se realizó usando placas fotoestimables Imaging Plate (FujiFilm).

## 7. SOPORTE INFORMÁTICO

Las imágenes de geles con DNA marcado radiactivamente fueron adquiridas con el sistema “Phosphorimager” FLA-3000 de Fujifilm. Estas imágenes fueron analizadas con los programas “ImageGauge” de Fujifilm y Quantity One de Bio-Rad. Las imágenes de geles de DNA teñidos con bromuro de etidio (BrEt) fueron adquiridas con el sistema de documentación “GelDoc 2000” de Bio-Rad. Estas imágenes fueron analizadas con el programa Quantity One 4.5.2, también de Bio-Rad.

Las imágenes de geles de proteínas teñidos con Sypro Ruby (Genomic Solutions) fueron tomadas con el proXPRESS Proteomic Imaging System de Perkin-Elmer. Las manchas de proteínas presentes en los geles de dos dimensiones (2D) fueron cuantificadas con el programa PDQuest 2D análisis 7.1.0 de Bio-Rad. Para el tratamiento matemático de los datos obtenidos a partir de la cuantificación se empleó la hoja de cálculo Excel 2002 de Microsoft.

La expresión de la proteína fluorescente verde (green fluorescent protein, GFP) en células neumocócicas se analizó midiendo la fluorescencia de las células en un espectrofotómetro LS-50B (Perkin Elmer), utilizando el programa FLWinlab 4.00.02 de Perkin Elmer.

## MÉTODOS

### 1. MÉTODOS GENERALES

#### 1. 1. Crecimiento y conservación de las estirpes bacterianas

Las estirpes de *S. pneumoniae* y *L. lactis* se crecieron en condiciones microaerófilas sin agitación. Para los cultivos de *S. pneumoniae* la temperatura de crecimiento fue de 37 °C y para su crecimiento en medio sólido se cubrió la capa basal de medio de cultivo, que contiene las células de neumococo, con una capa de medio más ligera. Para los cultivos de *L. lactis* la temperatura de crecimiento fue de 30 °C, siendo su crecimiento en medio sólido en superficie.

Las estirpes de *E. coli* en cultivo líquido se crecieron a 37 °C con agitación vigorosa en baños termostatzados. En medio sólido el crecimiento de los cultivos de *E. coli* fue en superficie. En el caso en el que fue necesario ralentizar el crecimiento bacteriano de la estirpe M15 [pREP4] durante la inducción, se utilizó una temperatura de crecimiento de 30 °C.

Tanto para *S. pneumoniae* como para *E. coli*, el crecimiento en medio líquido se siguió por turbidometría, midiendo la absorbancia de los cultivos a las longitudes de onda de 600 nm para *E. coli* y 650 nm para *S. pneumoniae*. Para ello se empleó un espectrofotómetro Milton Roy company, modelo Spectronic 20D. Todas las estirpes se conservaron a -70 °C, para lo cual se añadió a los cultivos un 10% de glicerol.

## **1. 2. Preparación y transformación de células competentes**

La preparación de células competentes de *S. pneumoniae* y su posterior transformación, se realizó según los métodos descritos por Lacks (Lacks, 1966). Las células de *E. coli* fueron transformadas por electroporación siguiendo el procedimiento descrito por Dower (Dower et al., 1988). Se utilizó el electroporador “Gene pulser” acoplado al “Pulse Controller” de Bio-Rad. Las condiciones de electroporación utilizadas fueron las siguientes: 25 µF, 2,5 kV y 200Ω. Tras someter las células al pulso eléctrico, se diluyeron en medio líquido SOC y se incubaron 1h a 37 °C y posteriormente se sembraron en placa para aislar los transformantes seleccionados con el antibiótico correspondiente.

## **1. 3. Preparaciones de DNA**

### **1. 3. 1. Preparaciones de DNA plasmídico**

Las preparaciones de plásmido de cultivos de *E. coli* y *L. lactis* se realizaron por el método de extracción alcalina descrito por Birnboim (Birnboim y Doly, 1979). En el caso de *S. pneumoniae* se usó el mismo método incluyendo las modificaciones descritas por Stassi (Stassi et al., 1981). En algunas ocasiones y solo para *E. coli* se siguió el método de Le Gouill (Le Gouill et al., 1994) utilizado por su sencillez y rapidez cuando

se tienen que analizar un gran número de transformantes. También se usó para este propósito el kit de preparación de DNA plasmídico de “Genomed” en la escala “Midi” y el kit “High pure plasmid isolation kit” de Roche en la escala “Mini”.

### 1. 3. 2. Preparaciones de DNA genómico

Los extractos crudos de *S. pneumoniae* se obtuvieron a partir de cultivos crecidos hasta una absorbancia de 0,7. Las células procedentes de 1,5 ml de cultivo se sedimentaron por centrifugación y se resuspendieron en 100 µl de una solución que contenía 730 mM de sacarosa, 150 mM de citrato sódico, 2,3 mM de deoxicolato sódico y SDS al 0,01% y 8 µg de RNasas. Las muestras se mantuvieron 15 min a 37 °C, se les añadió 1% de SDS y se pasaron tres veces a través de una aguja (25G 5/8 0,5X16 mm) para fraccionar el DNA genómico y así reducir la viscosidad de los extractos. Las muestras se desproteinizaron realizando dos extracciones con 100 µl de una mezcla 1:1 (v/v) de fenol y cloroformo-isoamílico (24:1) y se precipitó el DNA cromosómico con 0,3 M de acetato sódico pH 7,0 y etanol absoluto, resuspendiéndose posteriormente en 100 µl de TE 10:1 y almacenándose a -70 °C.

### 1. 3. 3. Obtención de fragmentos de DNA

Los fragmentos de DNA usados en esta tesis se describen en la Tabla 4. Algunos de ellos se obtuvieron mediante digestión con enzimas de restricción y otros por PCR (Innis et al., 1990). La digestión enzimática del DNA se realizó utilizando las soluciones y condiciones de reacción recomendadas por la casa suministradora.

Las reacciones de PCR se realizaron en el tampón proporcionado por el suministrador de la enzima DNA polimerasa. Se usaron las siguientes condiciones: 10 pmoles de cada oligonucleótido, 100 µM de cada uno de los dNTPs y 2 U de DNA polimerasa Taq, Pfu o DNAZyME, en un volumen final de 50 o 100 µl. La cantidad de DNA molde que se añadió a la reacción dependió del tipo de DNA, 100 ng si se trataba de DNA cromosómico y 40 ng cuando era DNA plasmídico u otro DNA lineal.

En todos los casos descritos, la concentración de DNA bicatenario se calculó mediante electroforesis en geles de agarosa o PAA, teñidos con BrEt, comparando la

intensidad de las bandas de DNA con la de fragmentos de tamaño similar y concentración conocida o utilizando el marcador de DNA “HyperLadder” de Bioline.

#### **1. 4. Manipulación enzimática del DNA**

El tratamiento del DNA con enzimas de restricción se realizó teniendo en cuenta las especificaciones recomendadas por el fabricante. En algunos casos se siguieron las indicaciones descritas por Sambrook (Sambrook et al., 1989b). La desactivación de las enzimas se realizó purificando las muestras mediante un proceso de extracción orgánica con una mezcla 1:1 (v/v) de fenol y cloroformo-isoamílico (24:1), seguida de una extracción con cloroformo-isoamílico (24:1), para finalmente recuperar el DNA por precipitación con acetato sódico 0,3 M pH 7 y etanol absoluto.

#### **1. 5. Elución y purificación de fragmentos de DNA**

Los fragmentos de DNA mayores de 500 pb se purificaron en geles preparativos de agarosa (0,8-1%) mediante extracción con fenol (Sambrook et al., 1989b), o usando el kit de extracción de gel “GeneClean Turbo” de Bio 101. Los fragmentos de DNA menores de 500 pb se purificaron a partir de geles preparativos de PAA (5%) según el procedimiento descrito por Maxam y Gilbert (Maxam et al., 1980), o usando el kit de extracción de gel “GeBAflex-tube” de Gene Bio-Application.

#### **1. 6. Secuenciación del DNA**

La correcta identidad de nucleótidos de todos los insertos genéticamente manipulados de los plásmidos o en el cromosómico de las bacterias, construidos en este trabajo, fue confirmada mediante secuenciación automática de DNA, utilizando el secuenciador ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems) del Servicio de Secuenciación del CIB.

## 1. 7. Electroforesis de DNA

### 1. 7. 1. Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis de DNA se realizó en geles horizontales de agarosa a una concentración variable entre 0,8 y 1,5% en función del tamaño de los fragmentos de DNA a analizar. La agarosa se disolvió en tampón TAE (ver composición en Tabla 5) conteniendo BrEt a una concentración final de 0,5 µg/ml. A las muestras se les añadió 0,1 volúmenes del tampón de carga SBE 3X (ver composición en Tabla 5) antes de ser aplicadas en el gel y la electroforesis se realizó a voltaje constante en el tampón usado para disolver la agarosa. Las dimensiones de los geles, así como la duración de la electroforesis y las condiciones de voltaje variaron según las características del DNA a analizar. El DNA se visualizó con el sistema de documentación de geles “GelDoc 200” de Bio-Rad, que consiste en un transiluminador de luz UV de onda corta (254 nm) con una cámara CCD acoplada para recoger las imágenes directamente en el ordenador.

### 1. 7. 2. Electroforesis en geles de poliacrilamida nativos

Para los experimentos de retraso en gel, y en algunos casos, para la resolución de fragmentos pequeños de DNA (50-500 pb), se utilizaron geles verticales no desnaturalizantes de poliacrilamida (PAA) al 5%. El tampón utilizado fue TBE (ver composición en Tabla 5). Los geles que se utilizaron fueron de 8,4 cm de ancho, 7,2 cm de largo y 0,75 mm de espesor y se prepararon usando el sistema Mini Protean-II de Bio-Rad. En todos los casos, los geles se sometieron a una pre-electroforesis de 1 hora. En la mayoría de las ocasiones se aplicó un voltaje de 100 V, aunque cuando fue necesario se aumentó el voltaje a 150 V. Antes de la aplicación en el gel, las muestras se disolvieron en tampón de carga SBE. Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron en tampón TBE con 0,5 µg/ml de BrEt durante 30 min. La visualización de las bandas fue, como en el apartado anterior, por iluminación con luz ultravioleta. Si la electroforesis se realizó con DNA marcado radiactivamente, que no iba a ser procesado posteriormente, los geles se incubaron 10 min en una solución de fijación con ácido acético al 10% y se deshidrataron mediante vacío a 80 °C. La visualización de las



bandas se realizó por exposición autoradiográfica, usando pantallas amplificadoras cuando fue necesario, o mediante el sistema Phosphorimager, si se iba a cuantificar el DNA radiactivo.

## **1. 8. Marcaje radiactivo del DNA**

Los fragmentos de DNA se marcaron radiactivamente internamente. La reacción de PCR se realizó según las condiciones descritas en el apartado 1.3.3 de este capítulo, añadiendo nucleótido radiactivo (150  $\mu$ M de [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP (actividad específica 3000 Ci/mmol y concentración 1mCi/ml). Los fragmentos de DNA así obtenidos se purificaron según se indica en el apartado 1.7.2 de este capítulo.

## **1. 9. Preparaciones de RNA**

El RNA procedente de 10 ml de cultivo se extrajo utilizando el kit denominado Qiagen RNeasy Midi de Qiagen, y la concentración de RNA se determinó por espectrofotometría UV. La integridad del RNA se comprobó por análisis en gel de 1% de agarosa. Además, la calidad y concentración del RNA también se comprobó usando el “RNA 6000 Nano assay” con el aparato “Agilent 2100 Bioanalyzer” de Agilent Technologies, de acuerdo con las recomendaciones de la casa comercial.

## **1. 10. Reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa**

La técnica de RT-PCR permite generar un DNA complementario (cDNA) de doble cadena a partir de un mRNA molde, gracias a la actividad de la enzima transcriptasa reversa (RT). Este proceso implica la síntesis de una cadena de DNA, por elongación de un cebador reverso unido al mRNA molde, mediante la actividad polimerasa dependiente de RNA de la enzima RT. En una segunda etapa, se lleva a cabo la síntesis de la otra cadena de DNA a partir de la cadena de DNA recién sintetizada, gracias a la actividad polimerasa dependiente de DNA de la enzima RT, dando lugar a una copia de cDNA de doble cadena que puede ser amplificado por PCR.

En la reacción de retrotranscripción, 400 ng de RNAs fueron añadidos a una mezcla de 20 µl que contiene 4 µl de tampón de síntesis de cDNA, 5 mM de DTT, 40 U de RNasaOUT (Invitrogen), 1 mM de mezcla de deoxinucleótidos trifosfato, 10 mM del oligonucleótido específico para el gen o genes en cuestión, y 15 U de la enzima Thermo-Script RT (Invitrogen) y se incubó 60 min a 60 °C. La reacción de transcripción reversa fue parada por incubación a 37 °C durante 20 min en presencia de 2 U de RNasa H (Invitrogen). Para la amplificación del fragmento deseado, 10% de la reacción de síntesis del cDNA, 50 pmoles de cada oligonucleótido, 500 mM de cada deoxinucleótido trifosfato, 3,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 mM de Tris-HCl pH 8,6 y 50 mM de KCl fueron usados para cada 50 µl de PCR, que fue realizada por 2 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen). Las condiciones de PCR fueron específicas para cada gen o fragmento a amplificar. El 12% de los productos de RT-PCR fueron analizados en geles electroforéticos de agarosa del 1,5%. La intensidad de los productos de PCR fue cuantificada con el programa Quantity One Gel Doc 200 (Bio Rad).

## **1. 11. Ensayo de extensión del cebador**

El cebador utilizado para detectar el sitio de inicio de la transcripción del *ycyF* fue 5'-TCCGAGATTGGTTTCTCA-3', realizando la extensión del cebador como se describe en (García-Quintans et al., 1998) con la modificación de que el cebador ha sido marcado con [<sup>32</sup>P] γATP como se describe en Sambrook y cols. (Sambrook et al., 1989a). Los nucleótidos no incorporados fueron eliminados utilizando las columnas de MicroSpin<sup>TM</sup> G25 (Amersham Biosciences). El tamaño de los productos de reacción se determinó mediante geles de 8% de poliacrilamida conteniendo 7M de urea. Las bandas marcadas con <sup>32</sup>P se detectaron por autorradiografía con films Kodak X-Omat S.

## **1. 12. Preparación de los extractos de proteínas**

### **1. 12. 1. Preparación de extractos de proteínas totales**

Los extractos crudos de *E. coli* se obtuvieron a partir de cultivos crecidos hasta una absorbancia de 0,4. Las células procedentes de 1 ml de cultivo se sedimentaron por

centrifugación y se resuspendieron en 100 µl de tampón de rotura (ver composición en Tabla 5). Para la electroforesis de estas proteínas se prepararon 10 µl de muestra a las que se les añadió 2,5 µl de colorante de carga SLB 5X y se desnaturalizaron por calentamiento a 100 °C durante 10 min antes de ser aplicadas en el gel. Las muestras se aplicaron en un gel lineal de SDS-PAA al 12,5%.

#### 1. 12. 2. Preparación de extractos de proteínas citosólicas

Los extractos de proteínas citosólicas de *S. pneumoniae* se obtuvieron a partir de cultivos crecidos hasta una absorbancia de 0,4. Las células procedentes de 100 ml de cultivo se sedimentaron por centrifugación y se congelaron a -70 °C. Los sedimentos congelados procedentes de estos 100 ml de cultivo se descongelaron y resuspendieron en 4,67 ml de tampón I y 330 µl del tampón 2 (ver composición de tampones en Tabla 5). Los extractos de proteínas citosólicas se obtuvieron por ruptura mecánica con una Prensa de French mediante tres ciclos aplicando una presión de 12,000 lb/in<sup>2</sup>, y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 13.200 x g durante 15 min, siendo el sobrenadante resultante alicuotado y guardado a -70 °C.

La concentración total de proteínas de los extractos se determinó por cuantificación de las bandas de proteínas después de fraccionar los extractos en geles de SDS-PAA al 12,5% y de teñir las proteínas con 0,25% de azul de Coomassie. La cuantificación se realizó con el programa Quantity One 4.2.1 en un “GelDoc 2000” de Bio-Rad. Como referencia para la concentración de proteínas se utilizó el marcador Mark 12 (Invitrogen, Carlsbad, USA). Se analizaron, en experimentos individuales, los lisados bacterianos conteniendo 100 µg de proteínas.

#### 1. 12. 3. Preparación de extractos de membrana

La obtención de proteínas presentes en extractos de membrana se realizó a partir de 150 ml de cultivos crecidos hasta una absorbancia de 0,4. Las células procedentes de estos cultivos se sedimentaron por centrifugación y se lavaron con 20 ml de tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al 0,1M y pH 6,0. El sedimento procedente de estos lavados se resuspendió en 5 ml del antedicho tampón enfriado a 4 °C al que se le añadió DNAsa I a una

concentración final de 102 µg/ml y Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a una concentración final de 10 mM. Los extractos de membranas se obtuvieron por disrupción mecánica con una Prensa de French mediante 2 ciclos aplicando una presión de 12,000 Ib/in<sup>2</sup>, incubando posteriormente dichos extractos durante 15 min a 30 °C. Posteriormente se añadió EDTA potásico a una concentración final de 15 mM y se centrifugó a bajas revoluciones para eliminar las células intactas. El sobrenadante procedente de esta centrifugación se ultracentrifugó a 135.000 x g a 4 °C durante 1 hora y el sedimento resultante se resuspendió en 20 ml de 0,1 M de carbonato sódico pH 11,0, manteniendo dicha suspensión con suave agitación durante 1 hora a 0 °C. Posteriormente, esta suspensión se ultracentrifugó a 135.000 x g durante 1 hora a 4 °C, lavando el sedimento con 2 ml de 50 mM de Tris-HCl pH 7,3 y resuspendiéndolo finalmente en 100 µl de IEF (ver composición en Tabla 5).

La concentración total de proteínas de los extractos de membrana se determinó mediante el fluorímetro Qubit™ (Invitrogen), usando el Quant-iT™ Protein Assay Kit y siguiendo las indicaciones dadas por Invitrogen.

### **1. 13. Preparación de vesículas de membrana**

La preparación de vesículas de membrana en *S. pneumoniae* se realizó siguiendo el método descrito por Wagner (Wagner et al., 2002), incluyendo una modificación que afecta al método de ruptura de las células, y se realizó una disrupción mecánica con una Prensa de French mediante un ciclo aplicando una presión de 12,000 Ib/in<sup>2</sup>.

### **1. 14. Marcaje de proteínas *in vivo***

La detección de la síntesis *de novo* de proteínas en *S. pneumoniae* se realizó a partir de 2 ml de cultivo, crecidos en AGCHY suplementado con 0,8% de sacarosa hasta una absorbancia de 0,4. Las células procedentes de este cultivo se sedimentaron por centrifugación y se resuspendieron en 2 ml de medio NOCH deficiente en leucina suplementado con 0,8% del azúcar correspondiente (sacarosa o maltosa) y con 5 µl de leucina tritiada (actividad específica 110 Ci/mmol y concentración 1 mCi/ml), incubando a continuación dicho cultivo a 37 °C el tiempo necesario para que se

produzca la síntesis de proteínas. A los tiempos indicados en el capítulo de Resultados, se tomaron alícuotas de 750 µl de cultivo y la reacción de marcaje se paró por adición del mismo volumen de medio NOCH frío con un exceso de leucina no radiactiva (10 mg/ml). Posteriormente, el cultivo se sedimentó por centrifugación, se lavó con TE (10:1) y el sedimento se congeló a -20 °C.

Antes de fraccionar los extractos proteicos en geles del 15% de SDS-PAA, las células fueron lisadas por descongelación del sedimento, se resuspendió en 20 µl de una mezcla que contenía 335 µl de TE (10:1), 5 µl de 0,1 M PMSF y 10 µl de DOC al 5% y se incubaron durante 5 min a 37 °C.

## 1. 15. Electroforesis de proteínas

### 1. 15. 1. Electroforesis de proteínas en una dimensión

Para la electroforesis de proteínas se prepararon geles lineales desnaturalizantes de PAA (acrilamida: bisacrilamida 30:0,8) con concentraciones variables de ésta entre 10 y 15% (gel separador) y a los que se les añadió una capa superior (gel concentrador) al 5% de PAA para compactar las muestras y obtener bandas más definidas. Las proteínas procedentes del marcaje de proteínas *in vivo* y de vesículas de membrana se analizaron en geles con un gradiente continuo del 10 al 20% de PAA. En ambos casos, tanto el gel concentrador como el gel separador contenían además 375 mM Tris-HCl pH 8,8 y 0,1% SDS. En ambos casos se usaron TEMED (0,06%) y PSA al 0,05% como catalizadores de la polimerización. Los geles se montaron en cubetas “Mini-Protean II y III” de Bio-Rad. La electroforesis se realizó en el tampón de electroforesis de proteínas a un voltaje constante de 150 V. A las muestras se les añadió el tampón de carga SLB (ver composición en Tabla 5) y se desnaturalizaron por calentamiento durante 5 min a 100 °C antes de ser aplicadas en el gel.

La tinción de los geles lineales se llevó a cabo con una solución de azul de Coomassie al 0,5% en una mezcla de agua: isopropanol: ácido acético glacial (6,5:2,5:1) durante 30 min a 60 °C. Para desteñir los geles se sumergieron en una solución de ácido acético al 10% y se mantuvieron a 60 °C durante un tiempo variable entre 30 min y 1h.

### 1. 15. 2. Electroforesis de proteínas en dos dimensiones

La separación de 100 µg de proteínas en una primera dimensión se realizó utilizando el sistema pHaser de Genomic Solutions con tiras de gel de pH 4-7 de Amersham Pharmacia. Las proteínas se mezclaron con el tampón de lisis IPG hasta un volumen final de 50 µl y con 350 µl de tampón de rehidratación (ver composición de los tampones en Tabla 5). Las tiras de gel fueron rehidratadas con los 400 µl totales durante toda la noche a 21 °C. Posteriormente se realizó el isoelectroenfoque de las proteínas durante 24 h. Una vez finalizada la carrera, las tiras se mantuvieron a -70 °C hasta que las proteínas fueron fraccionadas por electroforesis en geles de poliacrilamida.

Antes de correr la segunda dimensión, las tiras fueron lavadas con agua MilliQ y equilibradas con un tampón de equilibrio filtrado que contenía 52 mM de DTT durante 30 min, y después con el mismo tampón de equilibrio pero conteniendo 1,35 M de iodo acetato en lugar de DTT durante otros 30 min. Las proteínas fueron separadas en geles del 10% de duracrilamida. Los geles fueron hechos de acuerdo con el protocolo (Investigator<sup>™</sup> 2-D Electrophoresis System, manual de operaciones y mantenimiento), con la excepción de que los cristales fueron sellados con silicona. Los geles se mantuvieron a 4 °C entre una semana y un mes antes de ser utilizados. Estos geles de segunda dimensión se desarrollaron de acuerdo con el protocolo “Investigator<sup>™</sup> 2-D Electrophoresis System” usando el tampón ánodo, el tampón cátodo (ver composición de los tampones en Tabla 5) y el aparato “Investigador System” de Genomic Solutions. Los geles se tiñeron con el colorante fluorescente “Sypro Ruby” de Genomic Solutions siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Para visualizar estos geles, se utilizó el “Proteomic Imaging System” de Perkin Elmer.

Las manchas proteicas presentes en los geles bidimensionales se cuantificaron utilizando el programa de análisis PDQuest 2D Análisis 7.1.0 de Bio-Rad. Para cuantificar las proteínas se identificaron, en todos los geles, 136 manchas teñidas, usando éstas para normalizar la intensidad media.

### 1. 16. Ensayos de “Western-Blot”

En los experimentos de hibridación de western, las muestras se fraccionaron en geles de SDS-PAA al 10-15% y se electro-transfirieron a una membrana de

nitrocelulosa (Schleicher y Schuell BA85 0,45  $\mu\text{m}$ ) para lo cual se utilizó el aparato de transferencia “Mini trans-blot electrophoretic transfer cell” de Bio-Rad. La transferencia y la hibridación se realizaron según el protocolo descrito en (Zilhao et al., 1996). Para comprobar que tuvo lugar la transferencia y detectar los marcadores de peso molecular, la membrana se tiñó con la solución rojo de Ponceau (Sigma). Los anticuerpos policlonales contra el YycF fueron proporcionados por el Prof. Jerry Wells y empleados a una dilución 1:300.000. Como anticuerpo secundario se utilizó una dilución 1:30.000 de anti-IgG de conejo conjugados con fosfatasa alcalina comercial (Sigma). Tanto el proceso de incubación con los anticuerpos primario y secundario, como la detección quimioluminiscente basada en la fosfatasa alcalina, se realizaron según el protocolo del kit utilizado (Immun-Star Chemiluminescent Protein Detection System de Bio-Rad).

## 1. 17. Microscopía de fluorescencia

Para la detección de las bacterias marcadas con la GFP fluorescente, las células neumocócicas se crecieron en AGCHY, se sedimentaron por centrifugación a 6700 x g durante 10 minutos, y se lavaron y resuspendieron en el volumen original en tampón PBS a pH 8,0 (ver composición del tampón en Tabla 5). Las células se analizaron directamente, sin fijación, por microscopía de fluorescencia con un microscopio Zeiss Axioplan Universal, con un filtro de fluorescencia de excitación Standard FITC D480/30 y un filtro de emisión TBP 460/530/610 (Zeiss, Oberkochen, Germany). La GFP se detectó por excitación a 495 nm y con una emisión a 530 nm. Las áreas representativas de cada muestra fueron captadas usando un objetivo 100X y con una apertura numérica de 1,25.

Para la detección de DNA, el DNA se tiñó con 4', 6- diamidino-2 fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany). Los cultivos bacterianos fueron mezclados en la proporción 1:1 (v/v) con DAPI a una concentración de 0,1 mg/ml y teñido durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la tinción, las células se sedimentaron por centrifugación a 8600 x g durante 10 minutos y se lavaron y resuspendieron en el volumen original en tampón PBS a pH 8,0. El DNA teñido se detectó por excitación a 400 nm y con una emisión a 460 nm. Las áreas representativas de cada muestra fueron captadas usando un objetivo 100X y con una apertura numérica de 1,25.

## 1. 18. Medida de la actividad GFP

La expresión de la GFP en células neumocócicas se analizó midiendo la fluorescencia de las células en un espectrofotómetro LS-50B (Perkin Elmer, Norwalk, USA), por excitación a 488 nm con una rendija de 2,5, y una detección de la emisión a 511 nm con una rendija de 10, como se ha descrito previamente (Acebo et al., 2000). Las células se sedimentaron por centrifugación a 13.600 x g durante 10 min, y fueron lavadas y resuspendidas en tampón PBS en el mismo volumen inicial. Como fondo, se sustrajo de la fluorescencia detectada en las muestras, la fluorescencia del tampón PBS.

## 2. MÉTODOS ESPECÍFICOS

### 2. 1. Clonaje, hiperexpresión y sobreproducción del sistema de dos componentes YycFG en *S. pneumoniae*

Con el objetivo de investigar la función de este sistema de dos componentes esencial, hemos analizado la respuesta de *S. pneumoniae* a la sobreproducción de *yycF* o del SDC por hiperexpresión del gen *yycF* o de los genes *yycFG*, utilizando para ello el vector pLS1RGPF. Este plásmido contiene el gen *gfp* de *Aequorea victoria* que codifica la proteína autofluorescente verde (GFP) clonado bajo el control del promotor neumocócico  $P_M$  y el gen *malR*, que se expresa constitutivamente a partir del promotor P<sub>tetL</sub> y que codifica el represor transcripcional MalR (Nieto et al., 2000). Como se ha descrito e la introducción MalR reprime la expresión desde el promotor  $P_M$  cuando los cultivos se crecen en medio con sacarosa, mientras que la presencia de maltosa en el medio de cultivo conlleva la formación de un complejo intracelular maltosa-MalR inactivo, que provoca a la inducción de la expresión a partir de  $P_M$ .

Para clonar en el vector el gen *yycF* se utilizó como molde el DNA genómico procedente de la estirpe de *S. pneumoniae* R6, que fue amplificado por PCR con los cebadores rrNheI y rrXbaI, obteniéndose un fragmento de 765 pb. Este producto de PCR fue digerido con los enzimas de restricción NheI y XbaI y clonado en el sitio único XbaI de pLS1RGFP, entre el promotor  $P_M$  y el gen *gfp*. El plásmido resultante pRR se



transfirió en la estirpe de *S. pneumoniae* R6 y los transformantes se seleccionaron por resistencia a Em, marcador codificado por el plásmido.

Para clonar en el vector los genes *ycFG* se utilizó como molde el DNA genómico procedente de la estirpe de *S. pneumoniae* JNR7/87, que fue amplificado por PCR con los cebadores rrNheI y hkNheI, obteniéndose un fragmento de 2115 pb. Este producto de PCR fue digerido con el enzima de restricción NheI y clonado en el sitio único XbaI de pLS1RGFP, entre el promotor P<sub>M</sub> y el gen *gfp*. El plásmido resultante pRRHK se estableció en la estirpe de *S. pneumoniae* R6 y los transformantes se seleccionaron por resistencia a Em.

Posteriormente los plásmidos recombinantes pRR y PRRHK fueron transferidos a la estirpe capsulada JNR7/87 de *S. pneumoniae* y se seleccionaron por resistencia a Em. Las estirpes neumocócicas obtenidas se utilizaron para realizar posteriormente estudios genómicos y proteómicos.

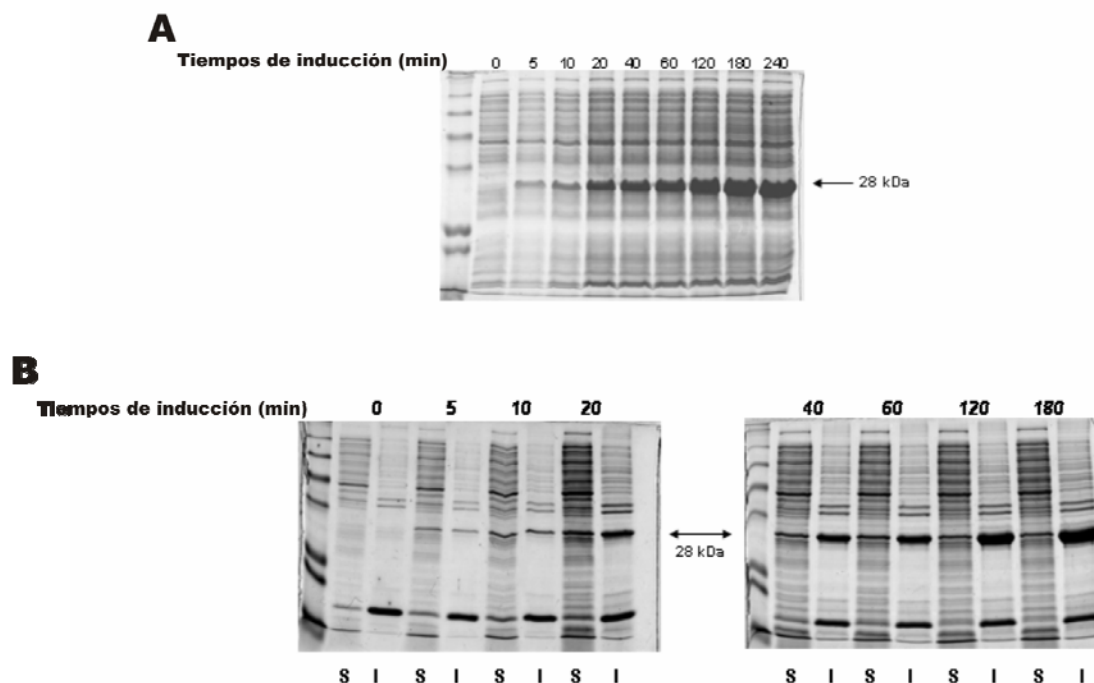
Las estirpes de *S. pneumoniae* que contenían los genes cuyos productos de expresión se querían hiperproducir, se indujeron transitoriamente o durante todo su ciclo de crecimiento (inducción continuada) como se detalla a continuación.

Las inducciones transitorias se realizaron cambiando la fuente de carbono del medio utilizando cultivos exponenciales no inducidos crecidos en medio con sacarosa por transferencia a un medio conteniendo maltosa durante los tiempos indicados en el capítulo de Resultados (de 5 min a 60 min). Los inóculos congelados a -70 °C se descongelaron, se diluyeron 1:1000 en medio AGCHY con 0,8% de sacarosa y fueron crecidos a 37 °C hasta una absorbancia de 0,4. Estos cultivos fueron posteriormente diluidos 1:100, en medio fresco que contenía 0,8% de sacarosa, manteniendo los cultivos en fase exponencial por dilución (al menos dos veces en cada experimento), manteniendo así la densidad celular por debajo de 0,4. Antes de realizarse la inducción, las células crecidas hasta una densidad óptica de 0,4 se sedimentaron por centrifugación a 6.700 x g a temperatura ambiente, y fueron resuspendidas en medio fresco precalentado AGCHY con 0,8% de maltosa (cultivo inducido) ó 0,8% de sacarosa (cultivo control).

Las inducciones continuadas se realizaron por crecimiento de los cultivos en presencia de 0,8% de maltosa y 0,2% de sacarosa hasta una absorbancia de 0,4. Los cultivos se mantuvieron en fase exponencial de forma similar que en la inducción a corto plazo, manteniendo la densidad celular por debajo de 0,4.

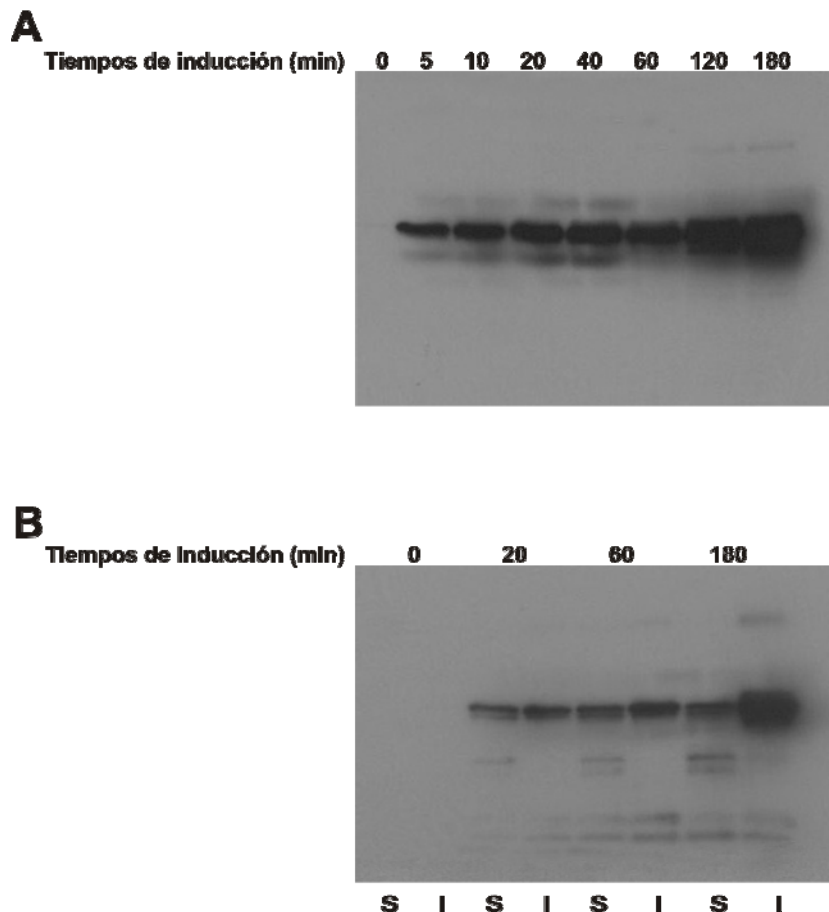
## 2. 2. Clonaje, hiperexpresión e hiperproducción YycF en *E. coli*

Para hiperexpresar *in vivo* el gen *yycF* e hiperproducir la proteína correspondiente, se utilizó el método de cromatografía de afinidad basado en la etiqueta de seis residuos de histidinas (His<sub>6</sub>). Para ello se utilizó el sistema de expresión basado en el vector pQE30 (Quiagen), que permite realizar fusiones traduccionales con la etiqueta His<sub>6</sub> en el extremo N-terminal de la proteína. Para llevar a cabo este propósito, el gen neumocócico *yycF* fue amplificado por PCR a partir del genoma de la estirpe JNR7/87 generándose el amplicón *yycF*-800 (ver detalles en Tabla 4) generado por PCR, siendo posteriormente este fragmento de DNA digerido con las enzimas BamHI y HindIII e introducido en el sitio de multiclonaje de pQE30. El plásmido recombinante obtenido pQE30RR permite la producción de la proteína YycF fusionada con una etiqueta de 6 residuos de histidinas en el extremo N-terminal (His<sub>6</sub>-YycF) por inducción con IPTG. Este plásmido fue transferido a la estirpe de *E. coli* M15 [pREP4] por electroporación. Esta estirpe permite la expresión de altos niveles de proteína y está mas regulada que otras estirpes de *E. coli*.



**Figura 18. Análisis de la producción de His<sub>6</sub>-YycF generado por cultivos de *E. coli* M15 [pREP4] [pQ30RR] inducidos a 37 °C.** El análisis se realizó en geles lineales desnaturizantes del 15% SDS-PAA. Los geles fueron teñidos con colorante azul de Coomassie. (A) Extractos totales de proteínas de cultivos inducidos con IPTG. (B) Fracciones solubles (S) o insolubles (I) de los extractos de proteínas totales a diferentes tiempos de inducción.

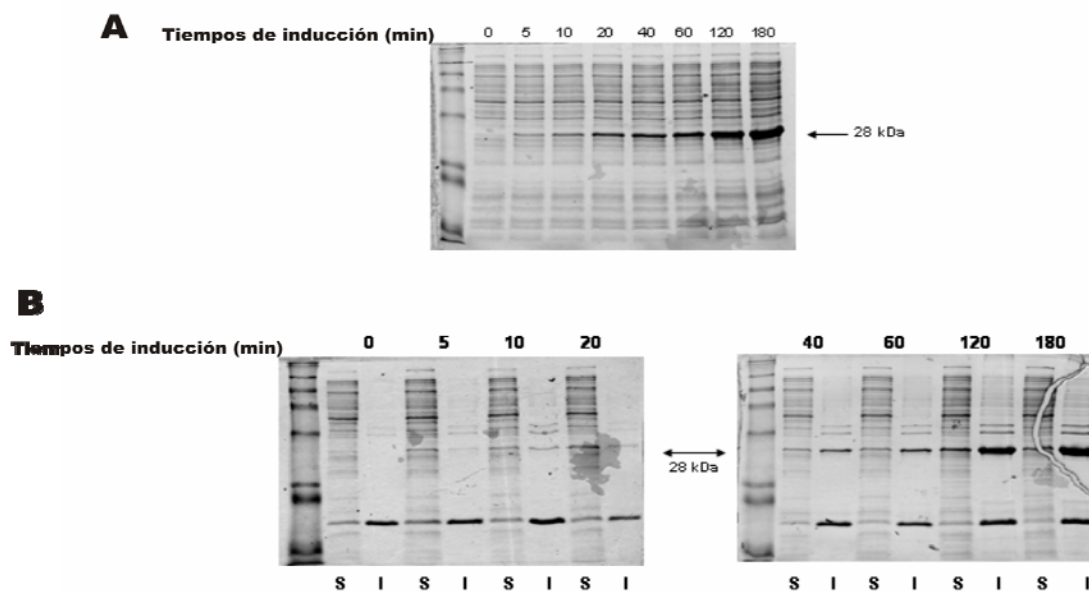
Las condiciones de inducción fueron estandarizadas testando el crecimiento a diferentes temperaturas. Inicialmente, los cultivos fueron crecidos en medio TY (2X) a 37 °C, con fuerte agitación, hasta una absorbancia de 0,4. En estos cultivos se indujo la hiperexpresión de *yycF* por la adicción de 1 mM de IPTG y posterior incubación a la misma temperatura durante 4 h. Los niveles de hiperproducción de la proteína y su solubilidad fueron analizados a diferentes tiempos de inducción por geles lineales desnaturizantes de PAA. (Figura 18). Como se muestra en la figura 18, el nivel del polipéptido migrando en la posición esperada para la proteína YycF aumenta conforme aumenta el tiempo de inducción (Fig. 18A).



**Figura 19. Análisis de la producción de His<sub>6</sub>YycF generado por cultivos de *E. coli* M15 [pREP4] [pQ30RR] inducidos a 37 °C mediante western blot.** El análisis se realizó en geles desnaturizantes del 15% SDS-PAA, transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Se utilizó como anticuerpo primario anticuerpos policlonales frente a YycF y como anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina. (A) Extractos de proteínas totales de cultivos inducidos con IPTG. (B) Fracciones solubles (S) o insolubles (I) de los extractos de proteínas totales a diferentes tiempos de inducción.

Para confirmar que ese polipéptido corresponde con la proteína YycF se realizó un western blot con anticuerpos frente a YycF, revelando que esta banda corresponde al regulador (Fig.19). El mayor nivel de YycF fue obtenido después de 4 h de inducción con IPTG (Fig.18A), encontrándose ésta mayoritariamente en forma insoluble (Fig.18B). En muchos casos, un incremento de la solubilidad de una proteína puede alcanzarse ralentizando y/o reduciendo su producción, para lo cual se puede reducir la temperatura de inducción o usar un medio definido como el M9. Para la estirpe de *E. coli* M15 [pREP4], el uso de medios definidos no está recomendado, por lo tanto, se realizó una segunda tentativa de la inducción a una temperatura más baja.

Se realizaron los crecimientos e inducción como se ha descrito anteriormente, pero cambiando la temperatura a 30 °C, y se procedió al análisis de la producción total de proteínas y de solubilidad a diferentes tiempos de inducción con IPTG (Fig. 20). El nivel máximo de producción de proteína fue obtenido después de 3 h de inducción (Fig. 20A). Sin embargo, la separación de proteína soluble e insoluble reveló que el mayor porcentaje de proteína soluble se alcanzó a las 2 h de inducción con IPTG (Fig. 20B).



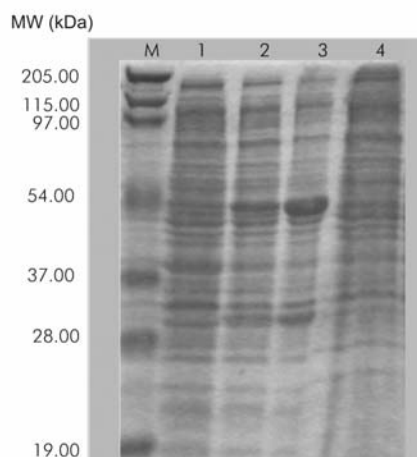
**Figura 20. Análisis de la producción de His<sub>6</sub>-YycF generado por cultivos de *E. coli* M15 [pREP4] [pQ30RR] inducidos a 30 °C.** El análisis se realizó en geles desnaturalizantes del 15% SDS-PAA, y los geles fueron teñidos con colorante azul de Coomassie. (A) Extractos de proteínas totales de cultivos inducidos con IPTG. (B) Fracciones solubles (S) o insolubles (I) de los extractos de proteínas totales a diferentes tiempos de inducción.

En base a los resultados obtenidos se consideró que las óptimas condiciones de crecimiento e inducción para producir proteína soluble eran crecimientos a 30 °C, en medio TY (2X) hasta una absorbancia de 0,4, y con una inducción empleando 1 mM de IPTG durante 2 h. Para la obtención de proteína insoluble, las condiciones óptimas de crecimiento e inducción fueron a 37 °C, en medio TY (2X) hasta una absorbancia de 0,4, y con una inducción empleando 1 mM de IPTG durante 3 h.

Con el objetivo de incrementar más la solubilidad de His<sub>6</sub>-YycF, se utilizó otro sistema de sobreproducción y purificación de proteínas, el sistema de expresión y purificación de proteínas bacterianas CASCADE<sup>TM</sup> (Biomedal). Este sistema está compuesto por el activador responsable del salicilato perteneciente al plásmido de degradación del naftaleno de *Pseudomonas putida*, *nahR*, y *xylS2*, una variante mutante del regulador XylS que reconoce y controla la expresión del operón meta en la ruta catabólica del tolueno/xileno en *Pseudomonas putida* y sus respectivos promotores Psal y Pm. En este sistema, la molécula inductora es el salicilato, de forma que cuando hay salicilato en el medio, NahR activa la transcripción desde Psal, expresándose XylS2. Además, el salicilato también activa la función reguladora de XylS2, amplificando sinérgicamente la transcripción a partir del promotor Pm. Este promotor Pm se encuentra en un plásmido, el pALEXA, que contiene el dominio 3' del gen *lytA* (proteína C-LYTAG) de *S. pneumoniae* entre el promotor Pm y el sitio de clonación múltiple en el que fue clonado el gen *yycF*. Para ello, se utilizó el mismo amplicón que en el caso anterior, el *yycF*-800 (Tabla 4), previamente digerido con las enzimas BamHI y HindIII, obteniéndose el plásmido pALEXRR. Este plásmido fue transferido a la extirpe de *E. coli* REG-1 (Biomedal).

Los cultivos fueron crecidos en medio Luria-Bertoni (Sambrook et al., 1989b) con una agitación de 200 rpm, a 37 °C, hasta una absorbancia de 0,8-1, y la inducción se realizó con 2 mM de salicilato, durante 5 h, a 30 °C, con una agitación de 200 rpm.

Con este sistema, la proteína recombinante C-lytA-YycF se encuentra mayoritariamente de forma insoluble.



**Figura 21. Análisis de la producción de C-lytA-YycF por *E. coli* REG-1[pALEXRR].** El análisis se realizó en geles del 12% SDS-PAA. Calles: (M) Marcador de peso molecular de proteínas; (1) Extracto de proteínas totales de cultivos sin inducir; (2) Extracto de proteínas totales de cultivos inducidos; (3) Fracción insoluble de los extractos de proteínas totales; (4) Fracción soluble de los extractos de proteínas totales.

## 2. 3. Purificación de YycF

### 2. 3. 1. Purificación de His<sub>6</sub>-YycF

#### 2. 3. 1. 1. Purificación de His<sub>6</sub>-YycF soluble

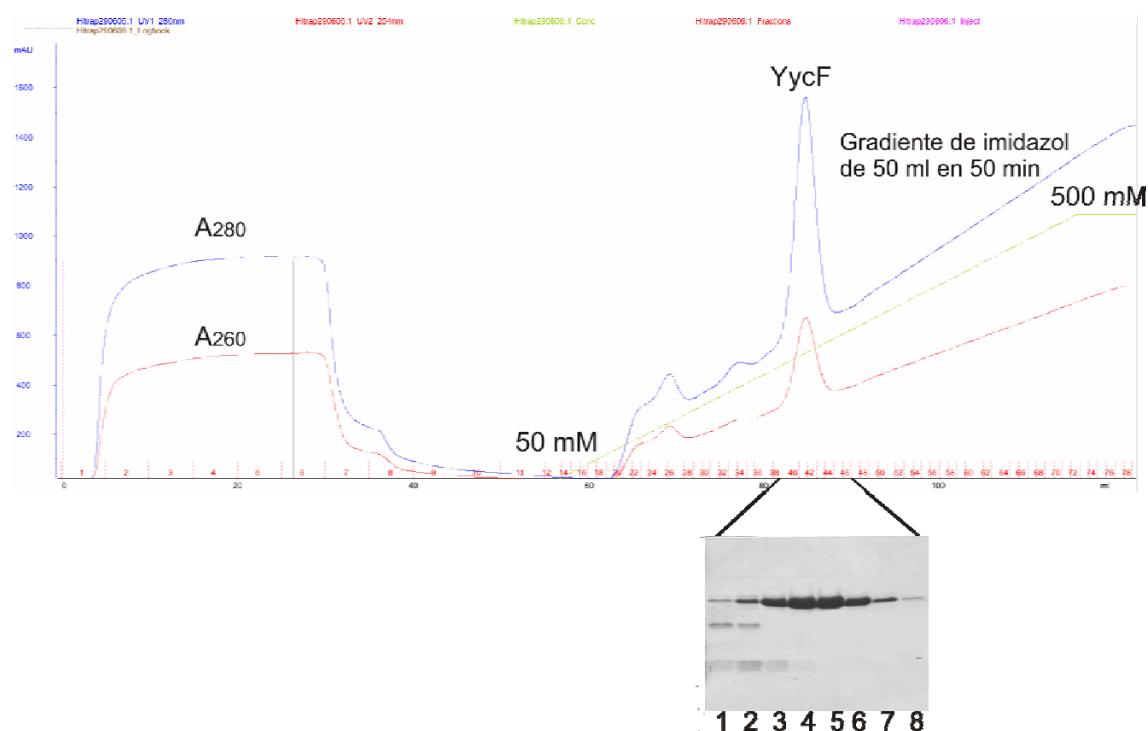
La purificación de la proteína de fusión His<sub>6</sub>-YycF se llevó a cabo usando el sistema de purificación HisTrap HP de Amersham Bioscience. Este sistema permite la purificación de proteínas fusionadas con etiquetas de histidinas a través de cromatografía de afinidad en un solo paso. Las columnas HisTrap HP se encuentran pre-empaquetadas y precargadas con una resina de Ni<sup>2+</sup> (Ni Sepharose High Performance) y permiten la purificación de proteínas recombinantes con etiquetas de histidinas por cromatografía de afinidad mediante inmovilización del ión metal.

Se estandarizaron las condiciones de sobreexpresión y purificación de la proteína, comprobándose que sólo podía obtenerse en forma soluble si estaba disuelta en tampones con 500 mM de NaCl. Finalmente, se adoptó el protocolo que se describe a continuación. Se crecieron 500 ml de cultivo de la estirpe *E. coli* M15 [pREP4] [pQE30RR] a 30 °C, con una agitación de 300 rpm, hasta alcanzar una absorbancia de 0,4. En ese momento, se indujo la hiperexpresión del gen *yycF* por la adición de 1 mM

de IPTG, y por incubación durante 2 h en las mismas condiciones de agitación y temperatura. Las células se recogieron por centrifugación, fueron lavadas con 0,85% de NaCl y resuspendidas en 25 ml de 50 mM de Tris-HCl pH 7,4 y 500 mM de NaCl (tampón A). La suspensión celular se sometió a disrupción mecánica con una Prensa de French mediante 3 ciclos aplicando una presión de 12,000 lb/in<sup>2</sup> y se clarificó por ultracentrifugación a 33.000 rpm durante 40 min a 4 °C. Para eliminar los ácidos nucleicos se añadió al sobrenadante un polímero policationico, la polietilenimina (PEI) (Burgess, 1991), a una concentración final de 0,2% (v/v). Se incubó con PEI durante 30 min a 4 °C y el precipitado se eliminó por centrifugación a 9.000 rpm, a 4 °C durante 30 min. Posteriormente se añadió (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a un 70% de saturación, y las proteínas que precipitaron se recogieron por centrifugación a 9.000 rpm y a 4 °C durante 20 min. Estas proteínas precipitadas se resuspendieron en 20 ml de tampón A y se dializaron durante toda la noche frente al mismo tampón para eliminar el sulfato amónico. A la muestra se le añadió 20 mM de imidazol y se aplicó a una columna de 5 ml HisTrap HP, usando el sistema de purificación AKTA, con un flujo de 0,5 ml/min para favorecer la unión de la proteína a la matriz de la columna. Después de aplicar la muestra, se realizó un lavado (10 volúmenes de columna) con el tampón A suplementado con 20 mM de imidazol. Las proteínas adsorbidas a la matriz se eluyeron mediante la aplicación de un gradiente lineal de 50 mM a 500 mM de imidazol, en un volumen de 50 ml, con un flujo de aplicación de 1 ml/min. Las fracciones de 1 ml recogidas durante la purificación fueron analizadas en geles PAA-SDS, revelando que la proteína His<sub>6</sub>-YycF se une a la columna y se eluye en un solo pico a unos 200 mM de imidazol. Se juntaron las fracciones centrales del pico de elución, en las que la proteína His<sub>6</sub>-YycF se encuentra en un mayor grado de pureza y concentración, y se dializaron frente a 2 litros de tampón A a pH 7,8 para eliminar el imidazol. La solución de YycF fue concentrada por filtración a través de filtros “Microsep” (Pall), con un tamaño medio de poro de 10 kDa, hasta que la concentración de la proteína fue de entre 0,8 a 1 mg/ml (28,6 a 35,8 μM). La proteína YycF concentrada se repartió en alícuotas de 50 μl que fueron congeladas a -20 °C para su conservación, obteniendo una concentración de His<sub>6</sub>-YycF de 4 mg/L.

La concentración de YycF se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm (A<sub>280</sub>), utilizando la fórmula

$$\text{Concentración (mg/ml)} = A_{280} / \epsilon \times b$$



**Figura 22. Análisis de la purificación de la proteína recombinante His<sub>6</sub>-YycF.** Cromatograma obtenido de la columna de afinidad HisTrap. Todas las fracciones fueron analizadas por geles de un 15% PAA-SDS, y los geles fueron teñidos con colorante azul de Coomassie. Las calles del 1 al 8 corresponden con el pico de la proteína recombinante YycF, siendo en las calles 4 y 5 donde la proteína se encuentra en mayor grado de pureza y concentración.

Esta fórmula permite conocer la concentración de proteína si se conoce su coeficiente de extinción molar a 280 nm ( $\epsilon$ ) (Simonian, 2001). En esta ecuación,  $\epsilon$  tiene unidades de  $\text{mg}^{-1} \times \text{ml} \times \text{cm}^{-1}$  y  $b$  es el paso óptico en cm. La determinación del coeficiente de extinción molar teórico de YycF se realizó a partir del valor de  $\epsilon$  de los aminoácidos aromáticos Trp, Tyr y Phe presentes en la proteína, obteniéndose un valor de  $20.400 \text{ mg}^{-1} \times \text{ml} \times \text{cm}^{-1}$ . Las medidas de  $A_{280}$  de YycF se realizaron en cubetas de cuarzo con un paso óptico de 1 cm, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401 o utilizando un Nanodrop ND-1000.

### 2. 3. 1. 2. Purificación de His<sub>6</sub>-YycF insoluble

La purificación de la proteína His<sub>6</sub>-YycF insoluble se realizó, al igual que en el caso de la proteína soluble, utilizando el sistema de purificación por cromatografía de afinidad HisTrap HP de Amersham Bioscience.



Medio litro de cultivo de la estirpe *E. coli* M15 [pREP4][pQE30RR] se creció a 37 °C, con agitación a 300 rpm, en medio TY(2X) hasta una absorción de 0,4 y se indujo la hiperexpresión de *yycF* por la adición de 1mM de IPTG y una incubación de 3 h en las mismas condiciones de agitación y temperatura. Se recogieron las células por centrifugación a 9.000 rpm y a 4 °C durante 20 min, se lavaron dos veces con 0,85 % de NaCl y se resuspendieron en 30 ml de tampón A. La lisis celular se llevó a cabo pasando la suspensión tres veces por una Prensa de French aplicando una presión de 12,000 Ib/in<sup>2</sup>. Los cuerpos de inclusión de YycF fueron sedimentados por ultracentrifugación utilizando un rotor Beckman 90Ti a 17.000 rpm durante 35 min y a 4 °C.

Para solubilizar la proteína presente en los cuerpos de inclusión se procedió a desplegarla y posteriormente a replegarla como se detalla a continuación. Los cuerpos de inclusión se resuspendieron en 15 ml de 6 M de hidrocloreuro de guanidinio (GuHCl) y 50 mM de acetato de amonio (Ac-NH<sub>4</sub>) pH 8,0 (tampón B), y se solubilizaron por sonicación durante 1 min. Las partículas restantes fueron eliminadas por ultracentrifugación utilizando un rotor Beckman 90Ti a 33.000 rpm y a 4 °C durante 40 min. A la fracción soluble se le añadió 10 mM de imidazol, y fue aplicada a una columna de 5 ml de HisTrap equilibrada con tampón B suplementado con 10 mM de imidazol. Después de lavar con 10 volúmenes de columna con tampón B suplementado con 50 mM de imidazol, se eluyó en un solo paso con 10 volúmenes de columna de tampón B suplementado con 500 mM de imidazol. Las fracciones que contenían la proteína His<sub>6</sub>-YycF fueron identificadas por geles PAA-SDS del 15%. La proteína parece no unirse fuertemente a la columna y eluyó durante el lavado de ésta en un volumen aproximado de 40 ml. Esta proteína fue dializada durante toda la noche frente al tampón B para eliminar el imidazol. Después de la adición de 10 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -MeEtOH), la concentración de proteína fue determinada midiendo la absorbancia a 280 nm en cubetas de cuarzo con un paso óptico de 1 cm, utilizando para ello un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401 y estimándose que la concentración era aproximadamente de 2 mg/ml (presumiblemente podrían existir interferencias en las medidas debido a la presencia de GuHCl). Se obtuvieron 4 alícuotas de 10 ml que contenía la proteína recombinante YycF desnaturalizada y fueron almacenadas a -80 °C. En estas condiciones, His<sub>6</sub>-YycF es estable y puede ser mantenida a -80 °C durante varios meses.

Para replegar la proteína His<sub>6</sub>-YycF, se diluyó hasta una A<sub>280</sub> de 1 mg/ml con un tampón que contenía 6 M GuHCl, 0,6 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 200 mM de Ac-NH<sub>4</sub> pH 7,8, 20 mM β-MeEtOH, 0,2 mM EDTA y 1,2 % de CHAPS. El replegamiento de la proteína se realizó mediante diálisis a 4 °C frente a un tampón que contenía 0,5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 mM de acetato amónico pH 7,8, 10 mM β-MeEtOH, 0,1 mM EDTA, 5% etilenglicol (tampón C), efectuándose 3 cambios de tampón C: 2 litros durante toda la noche, un litro durante 2 h y otro litro durante 1 h. Como la proteína replegada estaba muy diluida (menos de 0,6 mg/ml), se concentró por precipitación con 70% de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (durante 1 hora a 4 °C, en agitación suave). La proteína precipitada se sedimentó por centrifugación a 9.000 rpm a 4 °C durante 20 min y se resuspendió en tampón A a pH 7,8. Para eliminar los restos de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se dializó durante toda la noche, frente a tampón A a pH 7,8, obteniéndose una concentración de proteína de 1 a 1,5 mg/ml (correspondiente a 35,8 a 53,72 μM). Después de la diálisis, se le añadió 10% de glicerol a la preparación de His<sub>6</sub>-YycF y se almacenó a -20 °C, obteniéndose una concentración de 40 mg/L.

## 2. 3. 2. Purificación de C-LytA-YycF

### 2. 3. 2. 1. Purificación de C-LytA-YycF soluble

Para intentar obtener mayor concentración de proteína recombinante YycF de forma soluble se utilizó otro sistema de hiperexpresión y purificación, el sistema C-LYTAG (Biomedal), que está integrado dentro de la tecnología CASCADE<sup>TM</sup>. Este sistema bacteriano de expresión de proteínas está altamente regulado, utilizando circuitos de regulación en cascada para amplificar la expresión génica cuando está inducido, y manteniendo un nivel basal de expresión cuando no lo está.

La estirpe de *E. coli* REG-1 que contenía el plásmido pALEXRR se creció en 20 ml de medio LB, a 37 °C, con agitación constante a 200 rpm, hasta una absorbancia de 0,8. Alcanzado este punto, se indujo la síntesis de la proteína C-LytA-YycF por la adición de 2 mM de salicilato, y se transfirió el cultivo a 30 °C para evitar la insolubilización de la proteína durante la hiperproducción. El cultivo se mantuvo en estas condiciones durante 5 h, tiempo necesario para obtener el máximo nivel de

expresión. Transcurrido este tiempo, las células se recogieron por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 min a 4 °C, y se resuspendieron en una solución de lisis PROLYSE (Biomedal), manteniendo esta suspensión en hielo durante 20 min para favorecer la ruptura de las células. Los restos celulares y las proteínas insolubles se eliminaron por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 min a 4 °C.

Para purificar C-LytA-YycF se utilizó la resina C-LYTRAP (Biomedal). Para crear la columna de purificación, se empaquetó 250 µl de resina C-LYTRAP en una mini columna por centrifugación a 4.000 rpm durante 20 seg, eliminando el exceso de tampón que contiene la resina C-LYTRAP. Esta columna se preequilibró aplicando 4 volúmenes de columna con tampón de lavado (20 mM KPO<sub>4</sub> pH 7,0, 2 M NaCl y 0,1% de tritón X-100), centrifugando a 4.000 rpm durante 20 seg entre las aplicaciones del tampón de lavado. El sobrenadante obtenido de la lisis celular se aplicó a la columna y se centrifugó a 4.000 rpm durante 20 seg, lavando posteriormente la columna con 10 volúmenes de columna de tampón de lavado y volviendo a centrifugar a 4.000 rpm durante 20 segundos. A continuación se reequilibró con 2 volúmenes de columna de tampón de re-equilibrado (20 mM KPO<sub>4</sub> pH 7 y 0,1% de tritón X-100), se centrifugó a 4.000 rpm durante 20 segundos y se eluyó con tampón de elución (20 mM KPO<sub>4</sub> pH 7,0, 0,1% de tritón X-100 y 250 mM de cloruro de colina). El tampón de elución se aplicó a la columna y se centrifugó a 4.000 rpm durante 20 seg para eluir la proteína. Las fracciones fueron recogidas y analizadas por electroforesis en geles del 12% de PAA-SDS, revelando que la proteína recombinante C-LytA-YycF tiene un tamaño de unos 50 kDa y la mayoría se encuentra de forma insoluble, no obteniéndose apenas proteína soluble purificada (resultados no mostrados).

#### 2. 3. 2. 2. Purificación de C-LytA-YycF insoluble

Como se comprobó que con el sistema C-LYTAG la mayoría de la proteína recombinante se encontraba de forma insoluble, se procedió a la purificación de la misma. Para lo cual, se crecieron 50 ml cultivo de la estirpe de *E. coli* REG-1 con el vector pALEXRR a 37 °C, con una agitación constante de 200 rpm, hasta una absorción de 0,8. Seguidamente, el cultivo se indujo con 2 mM de salicilato y por incubación durante 5 h a 30 °C con agitación constante de 200 rpm. A continuación, el cultivo se sedimentó por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 min a 4 °C, y el sedimento se

resuspendió en 500 µl de 6 M GuHCl, manteniendo esta suspensión durante 1 h en hielo para favorecer la lisis celular y la solubilización de las proteínas insolubles. Esta suspensión celular se congeló y descongeló rápidamente para aumentar el rendimiento de la lisis. Los restos celulares y las partículas todavía insolubles se eliminaron por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante procedente de esta centrifugación se mantuvo en hielo mientras se preparaba la columna de purificación con la resina C-LYTRAP tal y como hemos descrito en el apartado anterior. Los pasos de purificación fueron similares a los realizados en el caso de la proteína soluble C-LytA-YycF y las fracciones recogidas fueron analizadas en un gel de un 12 % de PAA-SDS, obteniendo en este caso una concentración de proteína C-LytA-YycF de 20 mg/L.

## 2. 4. Ensayo de fosforilación de His<sub>6</sub>-YycF

Se realizaron ensayos de fosforilación *in vitro* de la proteína recombinante His<sub>6</sub>-YycF con acetil fosfato. YycF fue fosforilada con 20 mM de acetil fosfato en 50 a 200 µl de reacción que contenía 50 mM de Tris-HCl pH 7,8, 75 mM NaCl y 20 mM MgCl<sub>2</sub>, siendo el tiempo de reacción de 1 h a 37 °C. La concentración de proteína YycF que podía fosforilarse vino determinada por la concentración de NaCl (la proteína se encontraba en un tampón que contenía 500 mM de NaCl), ya que concentraciones superiores a 75 mM de NaCl reducían significativamente la proporción de proteína fosforilada que se obtenía. La proteína recombinante YycF no fosforilada, usada como control, fue incubada en el mismo tampón de fosforilación, a excepción del acetil fosfato, que fue eliminado. El porcentaje de proteína fosforilada fue determinado por cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography (HPLC)) en fase reversa con una columna Júpiter C<sub>4</sub> (Phenomenex) de 300A (4,6mm x 250mm) a 25 °C acoplada a un sistema AKTA (Amersham Pharmacia Biotech). Se utilizaron dos tampones, el tampón de fase A (20% de acetonitrilo y 0,1% de ácido trifluoroacético) y el tampón de fase B (60% de acetonitrilo y 0,1% de ácido trifluoroacético) para formar un gradiente de elución 80% de tampón fase A-20% de tampón fase B a 0% de tampón fase A-100% de tampón fase B en 40 min, con un flujo de aplicación de 1 ml/min. Los polipéptidos fueron detectados por monitorización a una absorbancia de 220 nm.

## 2. 5. Análisis de las interacciones proteína-DNA

Las reacciones de unión al DNA se realizaron en un volumen de 20  $\mu$ l conteniendo 1 nM del fragmento de DNA marcado radiactivamente con [ $\alpha^{32}$ P] dCTP (actividad específica 3000 Ci/mmol y concentración 1mCi/ml), 50 mM Tris-HCl pH 7,8, 500 mM NaCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>. Los complejos se formaron al mezclar la proteína His<sub>6</sub>-YycF purificada, a las concentraciones indicadas en el capítulo de Resultados, con diferentes fragmentos de DNA. Las mezclas de reacción fueron incubadas durante 30 min a temperatura ambiente. Como competidor se utilizó un competidor inespecífico, el poli (dI-dC) a una concentración de 25 ng/ $\mu$ l, o el fragmento de DNA PxSpn (ver detalles en Tabla 4) a una concentración de 1 nM. Las muestras se analizaron en un gel de PAA nativo al 5%, previamente sometido a preelectroforesis, en tampón TBE durante 2,5 h a 4 °C y 100V. Tras la exposición autorradiográfica del gel, los complejos proteína-DNA se detectaron por un cambio en la movilidad (retraso) de la posición de migración del DNA libre.

## 2. 6. Ensayo de autofosforilación de YycG

Los ensayos de autofosforilación de la proteína YycG se realizaron en un tampón que contenía 50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 50 mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0,33 mM NADH, 2,5 mM de fosfoenolpiruvato, 1mM ATP, 0,165 U de piruvato quinasa, 0,25 U de lactato deshidrogenasa de músculo de ratón (Sigma), 15  $\mu$ Ci de [ $\gamma^{32}$ -P]ATP (actividad específica 3000 Ci/mmol y concentración 1mCi/ml), 3,8 mM de para-nitrofenil fosfato, 0,5 mM de o-fosfo-l-treonina, 5 mM de o-fosfo-l-serina, 50 mM de ortovanadato sódico y 80  $\mu$ g de preparación de vesículas de membrana. La mezcla se incubó durante 10 min a 30 °C y se paró por la adición de un tampón de carga de SDS, que contenía 50 mM DTT, 4% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 12,5% de glicerol, 2,5 mM Na HPO<sub>4</sub>, 0,05% de azul de bromofenol y 5mM EDTA. Las muestras se analizaron en un gel del 10 al 20% PAA-SDS y las proteínas fosforiladas se revelaron por exposición autorradiográfica de los geles.

## 2. 7. Anál isis por ultracentrifugación analítica de la proteína His<sub>6</sub>-YycF

Este tipo de ensayos fueron realizados por el Servicio de Ultracentrifugación Analítica del CIB.

### 2. 7. 1. Equilibrio de sedimentación

Los experimentos de equilibrio de sedimentación se realizaron a una concentración de proteína His<sub>6</sub>-YycF de 36 a 54  $\mu$ M, en una ultracentrifuga analítica XL-A (Beckman), equipada con un sistema de detección óptica de la región de UV y visible, usando un rotor angular 50Ti, con celdas de centrífuga de seis sectores, paso óptico de 12 mm y la parte interna compuesta por una resina epoxy. Las condiciones experimentales que se utilizaron fueron a 20 °C a diferentes velocidades (12.000 y 15.000 rpm) y a diferentes longitudes de onda (235, 240 y 277 nm), dependiendo de la concentración de YycF. Todas las muestras (diferentes diluciones de la proteína) contenían His<sub>6</sub>-YycF disuelta en un tampón con 50 mM Tris-HCl pH 7,8, diferentes concentraciones de cloruro sódico (500 mM o 1,5 M) y en un caso 0,5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como se indica en el capítulo de Resultados. Después de alcanzar el equilibrio, se centrifugó a alta velocidad (50.000 rpm) para adquirir la señal de línea base. El cálculo de la masa molecular ( $M_r$ ) de YycF se determinó usando el programa HeteroAnál isis (Cole, 2004). El volumen específico parcial de YycF (0,738 ml/g) fue calculado a partir de la composición de aminoácidos con el programa SEDNTERP (Laue et al., 1992).

### 2. 7. 2. Velocidad de sedimentación

Los experimentos de velocidad de sedimentación se realizaron a 50.000 rpm, a una temperatura de 20 °C, usando las mismas condiciones de experimentación y el mismo instrumental que se utilizaron en los experimentos de equilibrio de sedimentación. Los perfiles de sedimentación fueron registrados cada 5 min a 277 nm. La distribución del coeficiente de sedimentación fue calculada por modelación de los datos de velocidad de sedimentación usando el método  $c(s)$  (Schuck, 2000). El análisis

de los perfiles de sedimentación por este método se realizó usando el programa SEDFIT.

## 2. 8. Síntesis *in vitro* de mRNA

Las reacciones de transcripción fueron realizadas a 37°C durante 15 min. en un volumen de 25  $\mu$ l que contenía 40mM Tris-HCl (pH 7, 4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 290 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 300  $\mu$ M de cada nucleótido ATP, GTP y CTP, 100  $\mu$ M de UTP, 0,25  $\mu$ M de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP (800 Ci x mmol<sup>-1</sup>, 10  $\mu$ Ci/  $\mu$ l), 1nM de cada DNA molde, 0,05  $\mu$ g/ $\mu$ l de BSA y 0,22 U (20 nM) de la holoenzima RNA polimerasa  $\sigma^{70}$ . Para testar el efecto de la proteína YycF la reacción de transcripción fue realizada después de unir el DNA con diferentes concentraciones de YycF. La reacción de unión de la proteína al DNA se realizó tal y como se describe en Materiales y Métodos, en un volumen de 20  $\mu$ l que contiene 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 364 mM NaCl, 2 mM Mg Cl<sub>2</sub>, 0,125 mM EDTA y 1,25 nM de DNA. Después de 30 min de incubación a temperatura ambiente, la transcripción se inició por la adicción de 5  $\mu$ l de una mezcla de nucleótidos trifosfato con la RNA polimerasa y la cantidad apropiada de cloruro magnésico. La reacción fue parada por la adición de volúmenes iguales de 2% de SDS y 100 mM de EDTA. Las muestras fueron filtradas a través de las columnas G-25 de MicroSpin (GE Healthcare) para eliminar los nucleótidos no incorporados y posteriormente se precipitó añadiendo 10  $\mu$ g de tRNA, acetato sódico pH 7 y 3 volúmenes de etanol. El sedimento se resuspendió en el tampón de carga de RNA (80 % de formamida desionizada, 1X Tris-borato EDTA, 0,025% de azul de bromofenol y 0,025% de cianol xileno) y analizadas en geles de 8% de urea-poliacrilamida y reveladas por autoradiografía. Como muestra estándar de peso molecular se utilizó una reacción de secuencia A+G Maxam y Gilbert de un amplicón de 174 pb generada por PCR usando los oligonucleótidos marcados radiactivamente en el extremo 5' con <sup>32</sup>P 5'-TAT GGA AGC AAC CAC GCT-3' y 5'-TCA GCA TAA CTG AGC C-3'.

## 2. 9. Marcaje fluorescente del RNA e hibridación de los microarrays

Los microarrays utilizados en este trabajo fueron contruidos por el grupo del Dr. Jerry Wells. Los fragmentos de DNA de los marcos de lectura abiertos presentes en la estirpe TIGR4 (JNR7/87) y algunos genes específicos de la estirpe R6 fueron amplificados utilizando oligonucleótidos específicos para estos marcos de lectura (MWG Biotech). Estas oligonucleótidos fueron diseñados siguiendo las indicaciones de Hinds y cols (Hinds et al., 2002), con una temperatura teórica de fusión de 60 °C. En total, fueron amplificadas mediante PCR 2236 sondas procedentes de la estirpe TIGR4 y 117 procedentes de la estirpe R6. Estas sondas fueron insertadas dentro del soporte sólido del microarray. Todas las PCRs fueron realizadas utilizando la DNA polimerasa *HotStart Taq* (Quiagen) en la máquina de PCR Primus-HT (MWG Biotech) utilizando los siguientes parámetros: 95 °C durante 15 min, seguido de 30 ciclos que contienen 95 °C durante 30 seg, 50 °C durante 30 seg y 72 °C durante 120 seg, con una incubación final a 72 °C durante 600 seg. Para la reacción de amplificación se utilizó, como DNA molde, 2,5 ng de DNA procedente de las estirpes TIGR4 y R6 y 100 pmoles de cada oligonucleótido en un volumen final de reacción de 50 µl. Para cada par de oligonucleótidos se obtuvo un solo fragmento de DNA cuya longitud fue analizada por electroforesis en geles de agarosa. También se incluyeron como controles negativos en estos arrays, 10 sondas que contenían marcos de lectura abiertos procedentes de *Campylobacter jejuni* que no poseen homología significativa con *S. pneumoniae*. Todos los productos de PCR fueron amplificados utilizando SigmaSpin 2 postreaction clean-up plates (Sigma), secados y resuspendidos en la mitad del volumen original en el tampón 3 x SSC (El tampón SSC 1X contiene 0,15 M de NaCl y 0,015 M de citrato sódico). A este tampón 3 x SSC se le añadió 0,01 % de Sarkosil antes de incluir estas sondas en el soporte sólido de microarray. Los productos de PCR fueron insertados en diapositivas de cristal GAPS II (Corning) utilizando una máquina de diseño de arrays House Stanford (ver la página <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide> para el programa y protocolo de utilización de esta máquina). Cada diapositiva de cristal contiene dos arrays, y cada array contiene dos sondas de cada gen.

Para el marcaje fluorescente del cDNA se usaron 15 µg de RNA total que fueron mezclados con 5 µg de oligonucleótidos al azar llevando el volumen final a 12,4 µl con agua. A continuación se añadieron los siguientes componentes: 3 µl de tampón RT 10X



(Stratagene), 0,6 µl de deoxinucleótidos trifosfato 50X (25 mM de cada uno de los deoxinucleótidos dATP, dGTP y dTTP y 10 mM de dCTP), 3 µl de 0,1 M DTT, 2 µl de Cy3 y Cy5 (Amersham-Pharmacia) y 4 µl de RT (Stratagene). La mezcla de la reacción fue incubada a 37 °C durante toda la noche. La reacción de la transcripción reversa fue parada por la adición de 1,5 µl de 20 mM de EDTA pH 8,0, 15 µl de tampón, 0,1 M de NaOH e incubación a 70 °C durante 15 min. La reacción fue neutralizada añadiendo 15 µl de 0,1 N de HCl antes de purificar el cDNA con un Kit de purificación de PCR (Quiagen). El cDNA eluido fue concentrado en un concentrador centrífugo tipo Speed-Vac (Savant) y resuspendido en una solución que contenía 25 µl de agua ultra pura (Sigma), 3 µl de DNA humano Cot1 (Invitrogen), 6 µl de SSC 20X, 1 µl de 1 M HEPES pH 7,0, 1 µl de 10% SDS y 4 µl de solución Denhardt 50X. La reacción de hibridación fue cubierta con un cubre (Sigma Hybri-slip), colocado en una cámara de hibridación (Gene machine) e incubado durante toda la noche a 62 °C. Posteriormente, los portaobjetos fueron lavados dos veces durante 5 min con tampón de lavado (SSC 2X, 0,1 % SDS), dos veces con tampón de lavado 2 (SSC 1X), y otras dos veces con tampón de lavado 3 (SSC 0,2X) antes de ser secados por centrifugación a 50 x g durante 5 min.

## 2. 10. Análisis de los datos de microarrays

Los datos de los análisis de microarrays fueron obtenidos de RNAs purificados de tres cultivos independientes de cada estirpe. Los microarrays fueron escaneados usando un escáner de microarrays Axon 4000A y las imágenes fueron obtenidas con el programa GenePixPro 3.0 (Axon). La media de cada celdilla que forma un microarrays, y la intensidad de fondo de la misma fueron importados en el programa GeneSpring 6.0 (Silicon Genetics). Los datos fueron normalizados por una normalización dependiente de intensidad (LOWESS(Cleveland y Devlin, 1988)) y el modelo de error estaba basado en repeticiones. Los datos se filtraron obteniéndose una lista de genes cuyos valores de inducción eran superiores a 1,75 veces. De esta lista se rechazaron los genes con valores de P superior a 0,01 (obtenido de los resultados de las pruebas t-Student de uno de los experimentos realizados con el programa GeneSpring), a excepción de los genes que se transcriben conjuntamente formando un posible operón (Ermolaeva et al., 2001). Posteriormente la lista de genes fue filtrada para eliminar los genes que eran afectados

por el sistema de expresión, determinados por el análisis de los datos de microarrays derivados de la hibridación de RNAs extraídos de la estirpe JNR7/87(pLS1RGFP) crecidos en presencia o ausencia de maltosa a 5 min o por inducción permanente ó continuada. Los resultados obtenidos con este método se correspondían con aquellos obtenidos por el empleo de un instrumento de análisis de expresión interno similar al descrito por Pearson (2003).

## **2. 11. Extracción de los ácidos grasos de membrana**

Para la determinación de la composición de ácidos grasos de membrana se utilizaron cultivos crecidos durante toda la noche a 37 °C en AGCHY suplementado con 0,8% de sacarosa hasta una absorbancia de 0,4. Estos cultivos fueron diluidos (dilución 1/100) en medio NOCH suplementado con 0,8% de maltosa y 0,2% de sacarosa. En este medio, también se modificó el hidrolizado de caseína y la albúmina, cuyas concentraciones fueron reducidas, respectivamente, a 0,05% y 0,01%. Estas modificaciones fueron necesarias para minimizar la incorporación de ácidos grasos presentes en el medio dentro de la membrana neumocócica. Los cultivos fueron mantenidos en fase exponencial diluyendo dos veces en medio fresco, manteniendo la absorción a 0,4. Después del crecimiento, los cultivos fueron centrifugados y el sedimento fue lavado con PBS. Los extractos de ácidos grasos totales celulares se prepararon por el método de Bligh and Dyer (Bligh y Dyer, 1959). Los ácidos grasos fueron determinados como metil-ésteres mediante una transesterificación de glicerolípidos con 0.5 M de metóxido sódico en metanol, y se identificaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas usando un cromatógrafo Perkin Elmer Turbo Mass equipado con una columna capilar de 30m x 0,25 mm (di) del tipo 100% dimetilpolisiloxano (PE-1; Perkin Elmer). Se usó un gradiente de temperatura de 140 a 240 °C a 4 °C/min con una velocidad de flujo de 1 ml/min con helio como gas de arrastre. Los patrones de referencia de ácidos grasos saturados e insaturados fueron obtenidos por Sigma Chemical Co. La posición del doble enlace en estos ácidos grasos insaturados fue determinada por espectrometría de gases-espectrometría de masas. Los metil-ésteres fueron convertidos en aductos de dimetil disulfuro como se describió previamente (Yamamoto et al., 1991) y separados en una columna PE-1 con un gradiente de

temperatura de 140 a 280 °C/min a 4 °C. Los espectros de masas por ionización de electrón (70 eV) se registraron a 1 s/scan en un rango m/z de 40-400.

## 2. 12. Marcaje isotópico de los ácidos grasos de membrana

El marcaje con  $^{14}\text{C}$  de los ácidos grasos sintetizados *de novo* en *S. pneumoniae*, se realizó a partir de 5 ml de cultivo crecido hasta una absorbancia de 0,4 en AGCHY suplementado con 0,8% de sacarosa. Las células procedentes de este cultivo se sedimentaron por centrifugación y se resuspendieron en AGCHY suplementado con 0,8% de maltosa, dejando inducir el cultivo a 37 °C durante 30 min. Posteriormente, el cultivo inducido se centrifugó y se resuspendió en 5 ml de medio NOCH sin acetato, suplementado con 3  $\mu\text{l}$  de acetato marcado radiactivamente con  $\text{C}^{14}$ , 0,8% de maltosa, 0,2% de sacarosa, 0,01% de albúmina y 0,05% de hidrolizado de caseína. A continuación, el cultivo se incubó durante 2 h a 37°C, se sedimentó por centrifugación, lavando después el sedimento dos veces con PBS y se extrajeron los ácidos grasos, convirtiéndolos posteriormente en metil-ésteres. Los metil-ésteres extraídos se resuspendieron en 200  $\mu\text{l}$  de hexano. Para determinar la radiactividad presente en las muestras se analizaron alícuotas de 30  $\mu\text{l}$  de cada una de ellas en un contador de centelleo. Posteriormente, se utilizó el volumen correspondiente a una radiactividad de 7000 cpm para analizar las muestras por cromatografía en capa fina.

## 2. 13. Cromatografía en capa fina

Para identificar y cuantificar los diferentes metil-ésteres obtenidos, y separarlos en fracciones de saturados e insaturados, se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina en placas impregnadas con 10% de nitrato de plata (placas Silica Gel G plates, de 0,5 mm de grosor, de Analtech). Estas placas, antes de utilizarlas, hay que activarlas manteniéndolas 2 h a -80 °C. Las muestras que se utilizaron se sembraron lo suficientemente distanciadas y se aplicaron con un tubo capilar. El desarrollo del cromatograma se realizó ascendentemente, utilizando como eluyente tolueno a -20 °C (Aguilar et al., 1998). Las distintas especies lipídicas fueron identificadas por comigración con patrones de *E. coli*.

## 2. 14. Anál isis de polipéptidos por espectrometría de masas

Los polipéptidos que mostraron, mediante el análisis en geles de dos dimensiones, niveles alterados en estirpes sobreexpresoras del YycF y/o YycFG, fueron identificados por espectrometría de masas después de su extracción de los geles.

Para extraer los fragmentos de gel de PAA que contenían las manchas polipeptídicas que querían identificarse, se utilizó la estación de trabajo robotizada Investigator ProPic<sup>TM</sup> de Genomic Solutions, depositando los fragmentos de gel de PAA en una placa de 96 pocillos. Para la manipulación y digestión con tripsina de los fragmentos de PAA y preparación de las placas de muestras para el espectrómetro de masas MALDI-TOFF, se utilizó la estación de trabajo Investigator ProGest<sup>TM</sup>. Las proteínas presentes en la poliacrilamida se lavaron tres veces durante 20 minutos con 100 µl de Solución A (recién preparada, con 80% 50 mM de bicarbonato de amonio y 20% de acetonitrilo). Después, el fragmento de gel se lavó con 100 µl de acetonitrilo durante 10-15 min, y se dejó secar al aire durante 10 min. Una vez seco, las proteínas se digirieron con tripsina (5 µl conteniendo 50 ng de tripsina en 100 mM de bicarbonato de amonio) y se incubaron a 37 °C durante 2-4 h. Al finalizar la incubación, se inactivó la tripsina con 5% de ácido fórmico durante 20 minutos, y las muestras se congelaron a -80 °C. Los péptidos tripticos, fueron analizados en el John Innes Center Protein Sequencing con un espectrómetro de masas “Matriz-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry” (MALDI-TOF-MS). Las proteínas se identificaron por análisis de los pesos moleculares de los péptidos en la base de datos de *S. pneumoniae* (<http://www.matrixscience.com/>).

## **RESULTADOS**



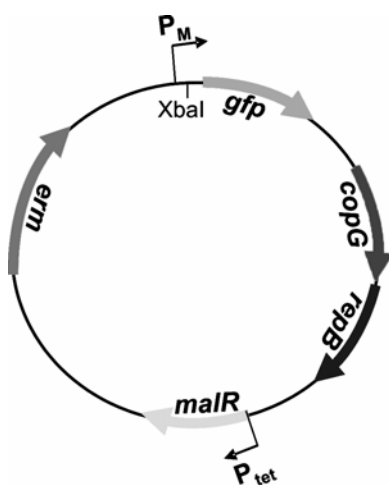
## CAPÍTULO 1: SISTEMA DE EXPRESIÓN INDUCIBLE EN *Streptococcus pneumoniae*

El regulador de respuesta YycF del SDC YycFG es esencial y los efectores naturales que inducen la expresión de este sistema son desconocidos. Por este motivo, con el objetivo final de caracterizar el regulón de YycFG, abordamos en este trabajo una estrategia de sobreexpresión controlada del SDC en multicopia a partir del promotor  $P_M$ , utilizando el vector pLS1RGFP. La expresión a partir de este promotor está reprimida cuando los cultivos se crecen en un medio con sacarosa y se inducen por crecimiento en un medio conteniendo maltosa. El represor neumocócico MalR es el responsable de esta regulación y controla la expresión de genes cromosomales de *S. pneumoniae* implicados en la utilización de maltosacáridos y maltodextrinas. Por ello, era de esperar que la inactivación de MalR en presencia de maltosa, conllevara un cambio drástico en la expresión génica y en el metabolismo central de *S. pneumoniae*. Por este motivo y antes de abordar la sobreexpresión del sistema YycFG, se procedió a tratar de identificar a nivel genómico y proteómico el regulón de MalR y los efectos pleiotrópicos del sistema de inducción, después de estandarizar la utilización del sistema en estirpes de *S. pneumoniae* portadoras de pLS1RGFP.

### 1. 1. Inducción de la expresión génica desde el promotor $P_M$

Para evaluar el sistema se utilizó *S. pneumoniae* JNR7/87 (también denominada TIGR4), que es una estirpe capsulada (serotipo 4) y por tanto patógena. Su genoma ha sido secuenciado (Bricker y Camilli, 1999), lo que ha permitido identificar sus genes e inferir la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas por ellos. Como consecuencia se han desarrollado microarrays (Mohedano et al. 2005) que permiten el análisis de la expresión de todos sus genes. Además, la huella peptídica teórica de la digestión triptica de sus proteínas está incluida en los bases de datos de dominio público. Así, después de analizar cuantitativamente la expresión de las proteínas en geles de dos dimensiones (2D), éstas pueden ser identificadas tras su escisión de los geles, digestión triptica y análisis de MALDI-TOF.

Para caracterizar el sistema regulado por MalR se construyó la estirpe JNR7/87[pLS1RGFP] por transformación genética de la cepa JNR7/87 con el plásmido pLS1RGFP. Este plásmido contiene el gen *malR* clonado en *cis* bajo el control del promotor constitutivo  $P_{tet}$  y el gen *gfp* clonado bajo el promotor inducible  $P_M$  (Fig. 23). Así, en las bacterias portadoras del plásmido, el represor MalR (codificado por el plásmido) controla la expresión de la fusión  $P_M$ -*gfp* y esta regulación puede ser valorada espectrofotométricamente por cuantificación directa de la fluorescencia de la proteína GFP.



**Figura 23. Mapa físico del plásmido pLS1RGFP.** Los genes codificados en el plásmido se representan por flechas que indican la dirección de la transcripción. Se indican los genes más relevantes que codifican proteínas implicadas en la replicación del plásmido (*copG* y *repB*), en la regulación de la expresión génica (*malR*), en la resistencia a eritromicina (*erm*) y la proteína GFP (*gfp*). Los promotores  $P_M$  y  $P_{tet}$  se encuentran representados por flechas que indican la dirección de la transcripción.

Para detectar la respuesta bacteriana en la estirpe JNR7/87[pLS1RGFP] al cambio de fuente de carbono (sustitución de sacarosa por maltosa) se utilizaron dos estrategias: (i) inducción con maltosa durante un tiempo corto, para evaluar la respuesta temprana y que denominamos inducción transitoria y (ii) crecimiento en presencia de maltosa, para evaluar la respuesta adaptativa y que denominamos inducción continuada.

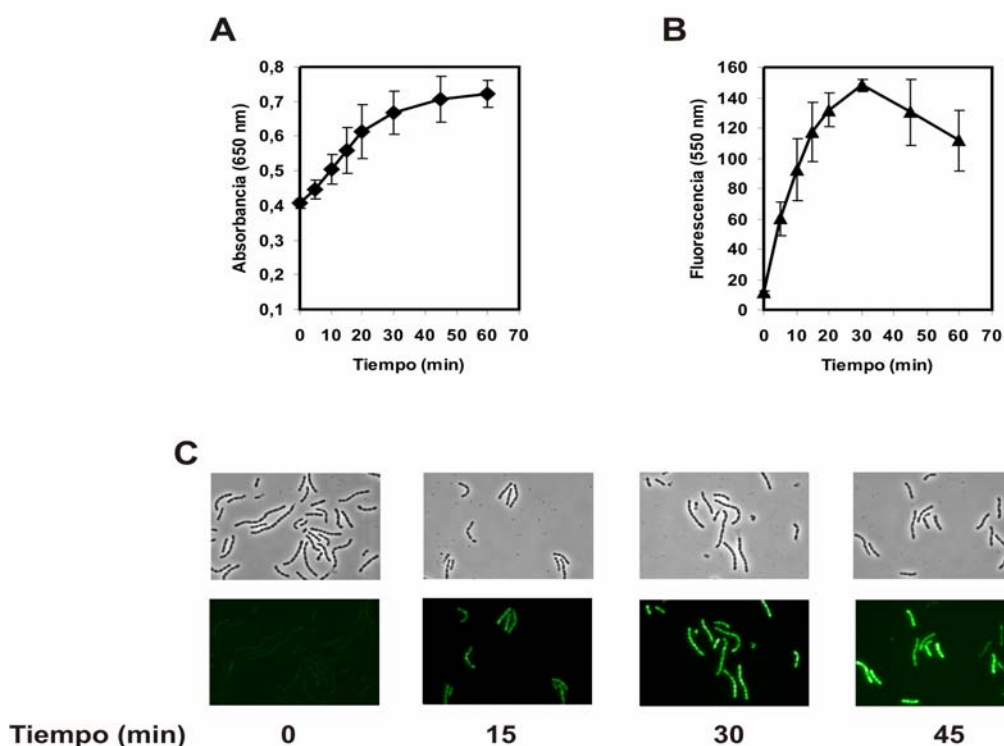
Para realizar la inducción transitoria, la estirpe JNR7/87[pLS1RGFP] se creció en medio AGCHY suplementado con 0,8% de sacarosa (ver detalles en Materiales y Métodos) y una vez alcanzada la mitad de la fase exponencial ( $OD_{650}=0,4$ ), los cultivos fueron: (i) transferidos a un medio de cultivo conteniendo maltosa al 0,8% (cultivo inducido) con el objeto de provocar la inactivación del regulador MalR o (ii)



mantenidos en medio conteniendo 0,8% sacarosa (cultivo no inducido). Posteriormente, los cultivos fueron incubados durante 60 minutos y durante este periodo se analizó su crecimiento y su fluorescencia (Fig. 24).

En ambos cultivos la estirpe continuó su crecimiento durante los siguientes 30 minutos, entrando posteriormente en fase estacionaria (Fig. 24A).

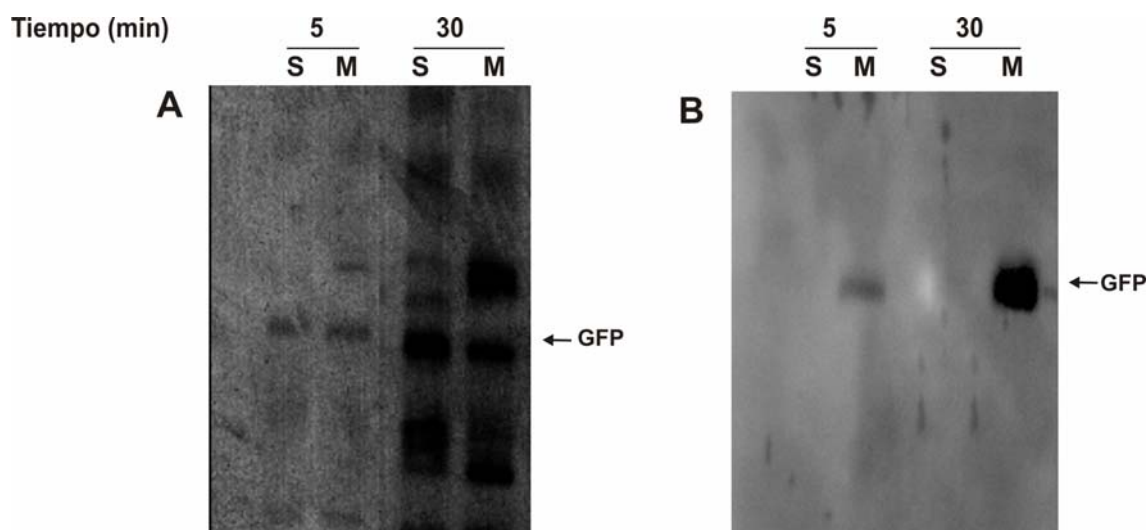
Cuando se midió la fluorescencia, se observó un comportamiento diferencial para los cultivos inducidos y los no inducidos. Solamente se detectaron niveles constantes y basales de fluorescencia en los cultivos no inducidos. Sin embargo, para los cultivos inducidos se observó que existía una relación entre el tiempo de exposición al inductor maltosa y la emisión de fluorescencia debida a la proteína GFP, de forma que, inicialmente, conforme aumentaba el tiempo de inducción aumentaba la fluorescencia, detectándose este incremento de fluorescencia a los 5 minutos de inducción y alcanzándose el nivel máximo de fluorescencia a los 30 minutos después de la adición de maltosa (Fig. 24B). A partir de ese tiempo, se detectó un descenso de la fluorescencia (Fig. 24B).



**Figura 24. Análisis de la curva de crecimiento y detección de fluorescencia de la estirpe JNR7/87[pLS1RGFP].** Los cultivos de la estirpe JNR7/87 que contienen el plásmido pLS1RGFP en fase exponencial fueron inducidos con maltosa a tiempo 0. La densidad óptica de los cultivos fue medida a distintos tiempos (A). La fluorescencia debida a la proteína GFP fue monitorizada a diferentes tiempos usando un espectrofotómetro (B) o un microscopio de fluorescencia (C).

Puesto que las mediciones se realizaron en tiempo real sin procesar las muestras, dicha reducción en los niveles de GFP era debida presumiblemente a la acidificación del medio de cultivo durante el crecimiento. Esta hipótesis está basada en el hecho de que la actividad de la proteína GFP se inhibe de forma reversible a pH ácido (Sullivan y Kay, 1999) y que en cultivos de *S. pneumoniae* su secreción de ácido láctico provoca una disminución de la fluorescencia de la GFP (Acebo et al., 2000). Además, dicha hipótesis fue avalada por la observación de los cultivos inducidos utilizando microscopía de fluorescencia. Para realizar dicho análisis se emplearon células intactas, lavadas y resuspendidas en un tampón PBS pH 7,0. No se detectaron cambios morfológicos debidos a la inducción y se comprobó que conforme aumentaban los tiempos de inducción aumentaba la intensidad de la fluorescencia (Fig. 24C). Además, no se observó, después de 30 minutos de inducción, la inhibición de la fluorescencia de la GFP detectada espectrofotométricamente (Fig. 24B).

Para confirmar la existencia de transcripción y traducción a partir del promotor  $P_M$ , se realizó un análisis de las proteínas sintetizadas durante la inducción con maltosa. Para ello, los cultivos crecidos en medio AGCHY suplementado con sacarosa, hasta una  $OD_{650}=0,4$  fueron centrifugados y resuspendidos en el medio definido NOCH conteniendo timidina tritiada y maltosa o sacarosa. Después de 5 y de 30 minutos de inducción, se tomaron muestras para posteriormente preparar extractos protéicos. Estos extractos fueron fraccionados en geles desnaturalizantes de PAA-SDS al 15%. A continuación, las proteínas fueron analizadas por dos métodos: (i) autorradiografía después de secar el gel, con el objeto de detectar las proteínas sintetizadas *de novo* durante la inducción e hibridación por Western con anticuerpos anti-GFP, después de su electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa, con el objeto de identificar la proteína GFP. El marcaje radioactivo reveló un incremento de las proteínas marcadas radiactivamente conforme aumenta el tiempo de exposición al agente radiactivo (crecimiento durante 5 o 30 min). Se detectó una banda de tamaño similar a la proteína GFP y que se encuentra solamente en los cultivos crecidos en maltosa (cultivos inducidos), aumentando el grosor de la banda conforme aumenta el tiempo de inducción (Fig. 25A), mientras que la hibridación por Western mostró que esa banda correspondía a la proteína GFP en los cultivos inducidos. Además, se confirmó que la concentración de GFP incrementaba en los cultivos inducidos conforme aumenta el tiempo de inducción (Fig. 25B).



**Figura 25. Detección de la proteína GFP en la estirpe JNR7/87[pLS1RGFP].** Los cultivos fueron crecidos hasta una absorbancia de 0,4 en sacarosa (S), y posteriormente crecidos, en medio NOCH suplementado con leucina tritiada, durante 5 o 30 minutos en presencia de maltosa (M) o sacarosa (S). Los extractos fueron analizados en geles de PAA-SDS al 15%. (A) Autorradiografía del gel y (B) hibridación por Western con anticuerpos anti-GFP.

Los resultados antedichos mostraron que el vector pLS1RGFP podía ser utilizado para estudiar expresión génica transitoria en *S. pneumoniae* JNR7/87.

Por otra parte, se estandarizaron las condiciones de inducción continuada. Inicialmente se procedió a crecer los cultivos en presencia de 0,8 % de maltosa como única fuente de carbono, estando así el sistema totalmente inducido, pero se comprobó que en la estirpe JNR7/87 este tipo de inducción tenía un efecto deletéreo, observándose una entrada temprana de los cultivos en la fase estacionaria ( $OD_{650}=0,4$ ) con respecto a los cultivos no inducidos ( $OD_{650}=0,8$ ). Por ello, se procedió a provocar una inducción parcial por adición combinada de azúcares (0,8 % de maltosa y 0,2 % de sacarosa) en el medio de cultivo. En estas condiciones, los cultivos no inducidos y los inducidos mostraron el mismo tiempo de duplicación  $23,1 \pm 1,7$  y el mismo patrón de crecimiento (resultados no mostrados). Por tanto, estas condiciones experimentales fueron utilizadas a lo largo de este trabajo experimental para provocar una inducción continuada.

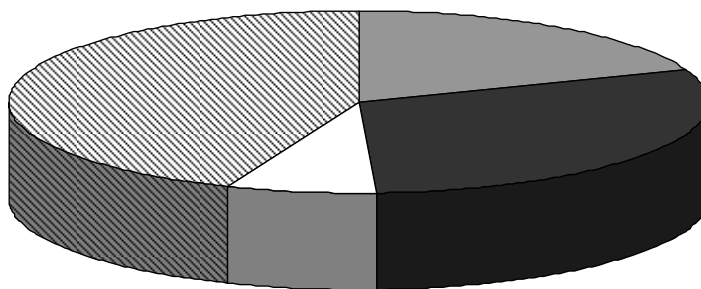
## 1. 2. Análisis transcripcional del sistema de expresión en *S. pneumoniae*

Para analizar el efecto de la inducción por maltosa en la estirpe JNR7/87[pLS1RGFP] a nivel transcripcional global, se utilizaron microarrays que

contenían por cuadruplicado sondas específicas para los 2236 genes de *S. pneumoniae* JNR7/87 (ver detalles de su preparación en Materiales y Métodos).

Para analizar los niveles de los RNA mensajeros, se hicieron preparaciones de RNA total de cultivos de JNR7/87[pLS1RGFP] crecidos en sacarosa o sometidos a una inducción con maltosa, continuada o transitoria, durante 5 minutos. Se utilizaron 3 cultivos independientes crecidos en cada una de las condiciones anteriormente mencionadas. Dichas preparaciones de RNA se utilizaron para sintetizar c-DNA marcado con Cy3 (muestras de los cultivos inducidos) o Cy5 (muestras de los cultivos no inducidos). Posteriormente, se utilizaron combinaciones Cy3/cy5 para realizar las hibridaciones con el DNA presente en los microarrays. Así, fueron obtenidos 12 resultados por cada condición de inducción y por cada gen analizado.

El análisis de los microarrays reveló que cincuenta y siete genes tenían afectados su nivel de transcripción en las dos condiciones de inducción estudiadas (Tabla S1, ver al final del capítulo de resultados y Fig. 26). Dichos genes codifican proteínas implicadas en cuatro categorías funcionales: (i) metabolismo de azúcares (44 %), (ii) metabolismo de purinas y pirimidínicas (30 %), (iii) otros metabolismos (3 %) y (iv) sistemas de transporte (23 %).



**Figura 26. Representación de las categorías funcionales afectadas tanto en la inducción continuada como en la inducción transitoria por el sistema de los maltosacáridos.** En gris se encuentran representados los genes afectados implicados en la biosíntesis de purinas y pirimidinas, a rayas los implicados en el metabolismo de azúcares, en blanco los implicados en otros metabolismos y en negro los implicados en transporte.

Como se esperaba, la expresión de los operones divergentes (*malMP* y *malXCD*) implicados en el metabolismo de los maltosacáridos aparecía incrementada tanto después de 5 minutos de inducción como después de una inducción continuada (SP2106-SP2110), al igual que el gen *malA* (SP2111). Entre *malX* y *malM* existen dos operadores de MalR caracterizados, denominados O1 y O2 (Nieto et al., 1997) y el

análisis bioinformático de las regiones localizadas delante de los genes u operones con expresión alterada nos permitió detectar varios operadores putativos de MalR localizados en las regiones promotoras de ocho genes (Fig. 27), cuya expresión se incrementaban en las dos condiciones de inducción analizadas (Tabla S1).

<b>A</b>	
<i>O1</i>	CGCAAACGTTTTCC
SP0758	TGCAAACGTTTTCG
SP0638	GGCAAACGCTTGCA
SP2239	CACAAAAGTTTTAC
SP0060	CGCAAAC TTTCGC
<b>B</b>	
<i>O2</i>	CGCAAACGTTTGCGT
SP1382	CGCAAACGTTTGCGC
SP0268	AGAAAACGCTTGCA
SP0668	CGCAAACCTTTGCAT
SP0342	TGCAAGCGTTTGCTT

**Figura 27. Alineamiento de los operadores O1 y O2 de MalR con secuencias localizadas en las regiones promotoras de genes implicados en el metabolismo y transporte de los maltosacáridos.** Se han identificado secuencias similares a la de los operadores de malR localizados delante de los genes *malX* (A) o *malM* (B) en los genes indicados. En rojo aparecen mostradas las diferencias existentes con las secuencias de los operadores O1 y O2.

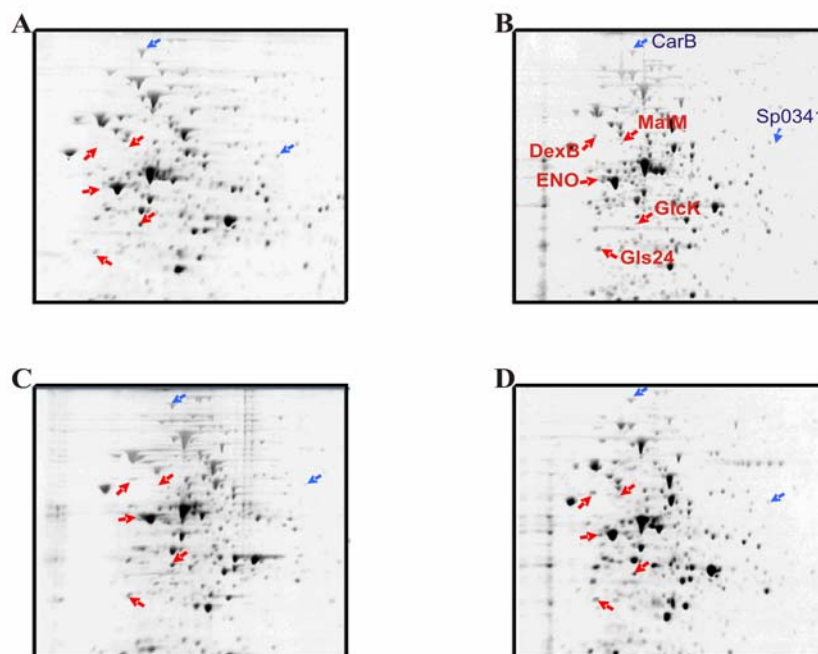
Cinco de estos genes codifican enzimas implicadas en el metabolismo de azúcares: La  $\alpha$ -amilasa y la amilopululunasa (codificadas respectivamente por los genes SP1382 y SP0268), codifican enzimas implicadas en la degradación de polisacáridos de más de tres unidades, unidos mediante enlaces  $\alpha$  (1-4), liberando moléculas de glucosa. DexB (codificada por el gen SP0342), que es una glucano  $\alpha$ -1,4 glucosidasa, está directamente implicada en el metabolismo de maltosacáridos y cuya función es degradar los polisacáridos unidos mediante enlaces  $\alpha$  (1-4) y la glucoquinasa (codificada por el gen SP0668), que está implicada en la fosforilación de la glucosa en posición 6. El gen SP060 codifica una  $\beta$ -(1-3)-galactosidasa, homóloga a las  $\beta$ -galactosidasas pertenecientes a la familia 35 de las glicosil hidrolasas. Los otros dos genes codifican sistemas de transporte: un sistema PTS (SP0758) y un sistema de transporte ABC (SP0636) específicos de azúcares.

El resto de genes cuyos niveles de transcripción aumentan al inducir los cultivos continuamente o transitoriamente con maltosa, en su mayoría están implicados en sistemas de transporte de azúcares, como por ejemplo, el operón implicado en el metabolismo de la manosa (SP0282-SP0284), implicado en el transporte de glucosa, manosa y fructosa.

También existen genes cuyos niveles de transcripción disminuyen al inducir continua o transitoriamente los cultivos. La mayoría de los genes cuyos niveles están reprimidos están implicados en el transporte y metabolismo de la sacarosa como fuente de carbono, como por ejemplo, el represor ScrR (SP1799).

### 1. 3. Análisis proteómico del sistema de expresión en *S. pneumoniae*

Para investigar la respuesta a nivel proteómico de la inducción con maltosa, los cultivos conteniendo el plásmido pLS1RGFP fueron sometidos a inducción transitoria durante 5 o 30 minutos o a una inducción continuada, utilizándose como control cultivos no inducidos crecidos en presencia de sacarosa.



**Figura 28. Análisis proteómico de la inducción de la estirpe de *S. pneumoniae* JNR7/87[pLS1RGFP].** Los extractos proteicos de cultivos de la estirpe JNR7/87[pLS1RGFP] crecidos en presencia de sacarosa (A) o inducidos durante 5 minutos (B), 30 minutos (C) o inducción continua (D) con maltosa, fueron analizados por electroforesis en geles de dos dimensiones, como se describe en el texto. Las flechas indican los polipéptidos que incrementan (rojo) o reducen (azul) su expresión en los cultivos inducidos con maltosa comparados con los cultivos no inducidos crecidos en presencia de sacarosa. El nombre completo de las proteínas y su función se describe en la tabla 6.

Los extractos de proteínas totales, se prepararon a partir de tres cultivos independientes crecidos en cada una de las condiciones antedichas, y fueron analizados por fraccionamiento en geles de dos dimensiones (2D). Todas las preparaciones celulares de *S. pneumoniae* mostraron unos perfiles 2D bien definidos (un ejemplo de cultivos no inducidos e inducidos se muestra en la Fig. 28), conteniendo aproximadamente 300 manchas protéicas distintas y cuantificables. Las diferencias en los perfiles de proteínas de estas muestras fueron analizadas y cuantificadas utilizando el programa de análisis de imágenes PDQuest (BIO-RAD).

Se observaron ocho manchas de proteínas con expresión alterada en cultivos inducidos de JNR7/87[pLS1RGFP] (Fig. 28). Dichas manchas fueron escindidas de los geles, digeridas con tripsina y analizadas por MALDI-TOF. Las proteínas se identificaron a través de la huella peptídica utilizando el programa bioinformática Mascot Search Tool (Matriz Science). La identificación de las proteínas, su función y sus niveles inferidos por la cuantificación de las manchas de proteínas están resumidos en la Tabla 6.

**Tabla 6. Proteínas afectadas por la inducción con maltosa, detectadas por análisis proteómico.**

Categoría funcional	Proteína <sup>1</sup>	Nivel de inducción <sup>2</sup>			Gen <sup>3</sup>	pI	Masa molecular
		5 min	30 min	Continuado			
Biosíntesis de purinas y pirimidinas	CarB	0,6	0,6	0,7	SP1275	4,51	116.058
Glicólisis/gluconeogenesis	GlcK	2,2	3,1	2,3	SP0668	4,62	33.536
	ENO	2	4,7	2,2	SP1128	4,42	47.103
Metabolismo de azúcares	MalM	1,8	2,7	7,4	SP2107	4,43	58.076
	LctO	1,6	2,5	1,1	SP0715	5,77	41.606
	DexB	2	4,3	4,8	SP0342	4,33	62.034
Estrés celular	Gls24	1,1	1,5	1,2	SP1804	4,33	21.816
Proteína hipotética	Sp0341	0,7	0,5	0,9	SP0341	5,51	55.064

<sup>1</sup>CarB, carbamoil-fosfato sintetasa, subunidad larga; glcK, glucoquinasa; ENO, enolasa; MalM, 4- $\alpha$ -glucanotransferasa; lctO, lactato oxidasa; DexB, glucano 1,6- $\alpha$ -glucosidasa; Gls24, proteína general de estrés 24; Sp0341, proteína hipotética conservada.

<sup>2</sup>Los niveles de inducción están expresado como el cociente de la intensidad de las manchas detectado en los cultivos inducidos y no inducidos.

<sup>3</sup>Número del gen en el genoma de TGR4.

De las ocho proteínas que fueron identificadas, tan sólo dos presentaban sus niveles reducidos cuando se inducía el sistema con respecto al control (cultivo crecido en sacarosa como fuente de carbono). Una de ellas es una proteína implicada en la biosíntesis de pirimidinas (CarB) cuya expresión también se detectó alterada en el análisis por microarrays. La otra proteína tiene una función desconocida.

Existían cinco proteínas que, a todos los tiempos de inducción, mostraban incrementados sus niveles protéicos con respecto a la condición de control. Todas ellas están implicadas en el metabolismo de la bacteria. GlcK y ENO, implicadas en la glicólisis, y LctO, que está implicado en el metabolismo de ácido láctico (Gibello et al., 1999). MalM y DexB, como se ha detallado previamente, están implicadas en el metabolismo de maltosacáridos y la alteración de los niveles de estas proteínas, corroboraba los resultados obtenidos para sus correspondientes genes en el análisis con microarrays (Tabla S1).

Sólo una proteína, el producto del gen SP1804, aparecía incrementada únicamente en la inducción continuada. Esta proteína es homóloga a la proteína 24 (Gls24) de *E. faecalis*, y en este hospedador está implicada en resistencia general al estrés (Giard et al., 2000). La falta de detección de alteraciones en los niveles de expresión de su gen codificante indicó una alteración a nivel postranscripcional.



## CAPÍTULO 2: ANALISIS FUNCIONAL IN VIVO DEL SISTEMA DE DOS COMPONENTES ESENCIAL DE *Streptococcus pneumoniae*

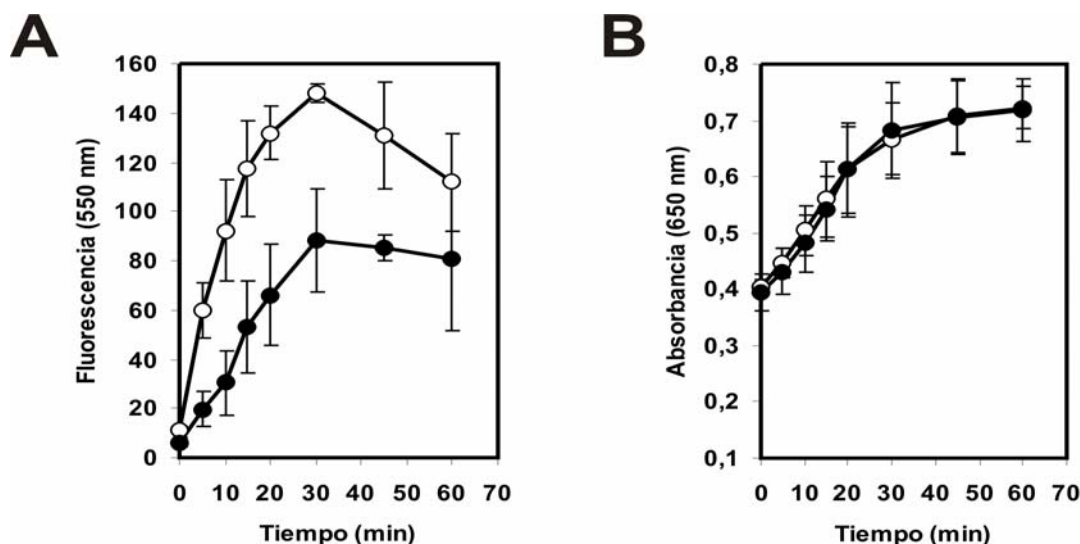
Para analizar la función que desempeña el SDC esencial de *S. pneumoniae* YycFG, teniendo en cuenta que los efectores naturales que inducen su expresión son desconocidos, diseñamos una serie de análisis genómicos y proteómicos que nos permitieran obtener una comprensión global de la función de este sistema, a través de la sobreexpresión del regulador de respuesta YycF en *S. pneumoniae* utilizando el sistema de hiperexpresión basado en el plásmido pLS1RGFP que habíamos validado anteriormente en este trabajo. Los resultados de estos experimentos se muestran a continuación.

### 2. 1. Hiperexpresión del regulador de respuesta *yycF* de *S. pneumoniae*

Para sobreproducir de forma controlada el regulador YycF en *S. pneumoniae* se clonó su gen codificante *yycF* en el vector pLS1RGFP. El gen *yycF* fue insertado entre el promotor  $P_M$  y el gen reportero *gfp*, generando el plásmido pRR (ver detalles en Materiales y Métodos). La fusión transcripcional  $P_M$ -*yycF*-*gfp* generada en pRR permitía utilizar la proteína GFP como un marcador para monitorizar la actividad del promotor inducible y la expresión del gen *yycF*. El plásmido pRR fue construido en la estirpe neumocócica no capsulada R6 y posteriormente transferido por transformación a la estirpe capsulada JNR7/87 para estudiar en ella los efectos de la sobreproducción de YycF en *S. pneumoniae*.

Las estirpes JNR7/87[pRR] y JNR7/87[pLS1RGFP] se indujeron transitoriamente y se analizó tanto su crecimiento como la expresión de la proteína GFP codificada por sus plásmidos (Fig. 29). Ambas estirpes mostraron el mismo patrón de crecimiento durante los 60 minutos de inducción analizados (Fig. 29B), indicando que la inducción del gen *yycF* desde el promotor  $P_M$  no afectaba al crecimiento bacteriano. El patrón de expresión de la proteína GFP a partir de ambos plásmidos fue similar, pero la presencia del gen *yycF* entre el promotor y el gen *gfp* conllevó a una leve disminución de los niveles de GFP en la estirpe JNR7/87[pRR]. En ambas estirpes se detectó a los 5 minutos de inducción, un incremento en la fluorescencia, observándose el nivel máximo de actividad de la GFP a los 30 minutos de inducción. Por ello, se seleccionaron estos

dos tiempos de inducción (5 y 30 minutos) para la realización de los experimentos posteriores.



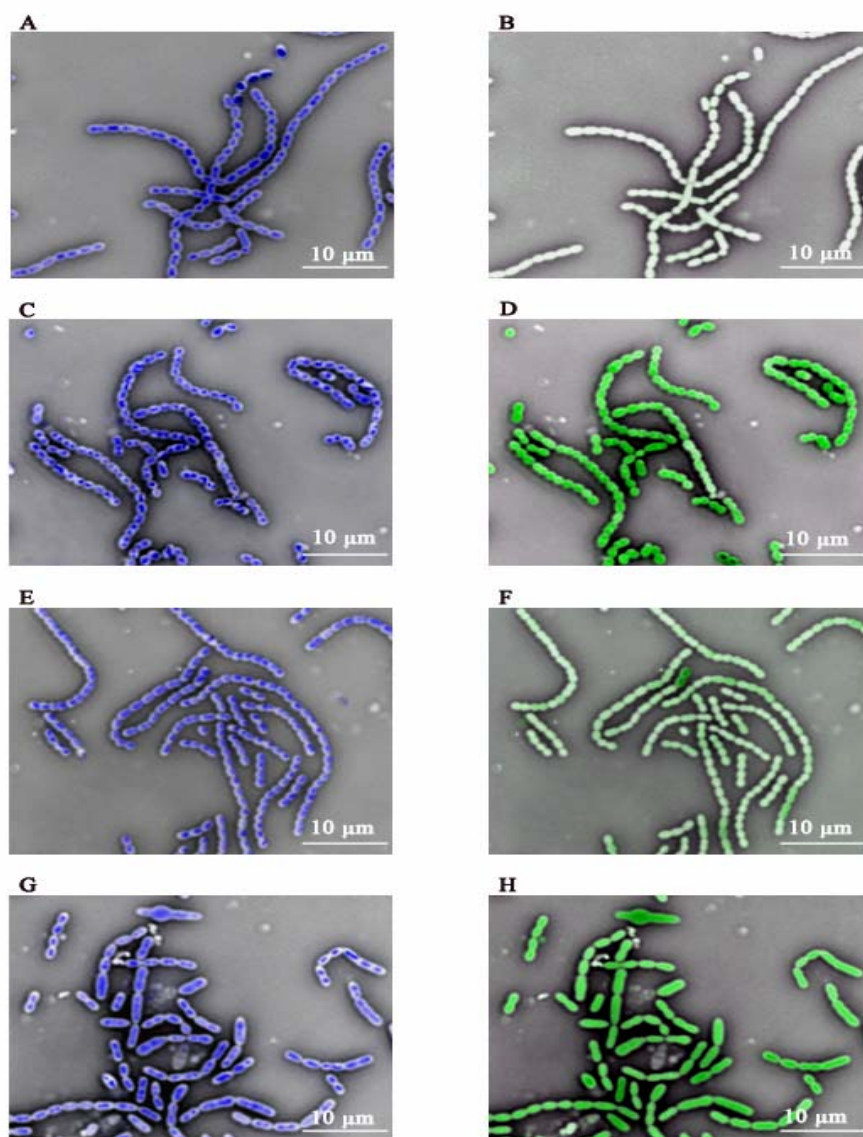
**Figura 29. Análisis de la curva de crecimiento y detección de fluorescencia de la estirpe JNR7/87[pLS1RGFP].**

Los cultivos de la estirpe JNR7/87 que contienen el plásmido pLS1RGFP (○) o pRR (●) en fase exponencial fueron inducidos con maltosa a tiempo 0. La densidad óptica de los cultivos fue medida a distintos tiempos (B). La fluorescencia debida a la proteína GFP fue monitorizada a diferentes tiempos usando un espectrofotómetro (A).

También se analizó el efecto de la sobreexpresión de *yycF* durante la inducción continuada. El crecimiento en presencia de 0,8% de maltosa y 0,2% de sacarosa sólo provocó un aumento del tiempo de duplicación de  $23,1 \pm 1,7$  a  $40,0 \pm 6,2$  cuando las células portaban el plásmido pRR en lugar del vector. En estas condiciones, ambas estirpes permanecieron en fase exponencial hasta densidades ópticas superiores de 0,5 a 650 nm. En consecuencia, esta combinación de azúcares y una densidad óptica de 0,4 a 650 nm fueron seleccionadas para realizar posteriores experimentos.

También se analizó el efecto de la inducción continuada en la división celular, en el contenido de DNA de las células y la expresión de la GFP mediante microscopía (Fig. 30). Para ello, cultivos exponenciales de las estirpes portadoras del plásmido pRR o el vector fueron crecidos en presencia de sacarosa o sacarosa y maltosa. A continuación, las bacterias fueron teñidas con DAPI y se analizaron por microscopía de contraste de fase (Fig. 30 A, C, E y G) o de fluorescencia (Fig. 30 B, D, F y H) para detectar su DNA o la GFP sintetizada por ellas (ver detalles en Materiales y Métodos). En los cultivos no inducidos de ambas estirpes se observó la misma morfología celular

con aparición de filamentos (Fig. 30 A, B, E y F), acompañada de una acumulación homogénea de DNA (Fig. 30 A y E) y de niveles basales de GFP (Fig. 30 B y F). Sin embargo, bajo condiciones de inducción continuada, la presencia del plásmido pRR (Fig. 30 G y H), y no del vector (Fig. 30 E y F), provocó alteraciones en la morfología de algunas de las células, y sólo en ellas se detectó una acumulación anómala del DNA (Fig. 30G *versus* Fig. 30E) y GFP (Fig. 30H *versus* Fig. 30F). Estos resultados indicaban que la sobreproducción de YycF afectaba la división celular.



**Figura 30. Detección de la expresión de GFP y DNA teñido por microscopía de fluorescencia.** Los cultivos de *S. pneumoniae* JNR7/87[pLS1RGFP] (A hasta D) y JNR7/87[pRR] (E hasta H) en fase exponencial fueron crecidos en un medio conteniendo sacarosa (A, B, E y F) o sacarosa y maltosa (C, D, G y H). El DNA celular fue teñido con el colorante DAPI. El DNA teñido (A, C, E y G) y la GFP fluorescente (B, D, F y H) fueron detectadas por microscopía de fluorescencia. En las imágenes G y H pueden observarse células con morfología anómala que acumulan DNA.

## 2. 2. Análisis transcripcional de *S. pneumoniae* después de la inducción del gen *yycF*

Se realizó, mediante un análisis con microarrays, una comparación global de los niveles de expresión génica en las estirpes JNR7/87[pRR] y JNR7/87[pLS1RGFP], después de que los cultivos fueran inducidos continuamente o transitoriamente durante 5 min con maltosa (ver Materiales y Métodos). Como réplicas biológicas se utilizaron tres cultivos independientes de cada estirpe y los datos promedios fueron obtenidos por la media de 12 muestras por cada gen.

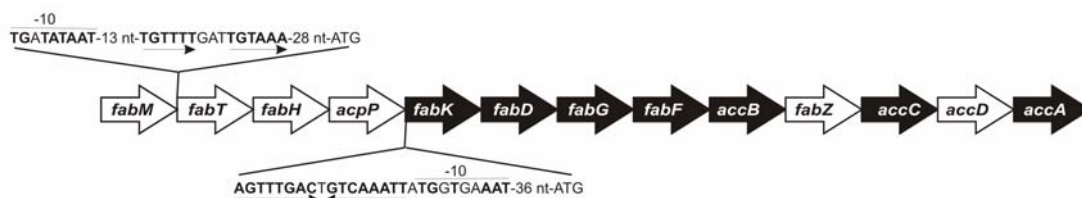
Una lista completa de los genes afectados a nivel transcripcional por la inducción transitoria durante 5 min y continuada del gen *yycF* y su clasificación funcional se encuentran en las tablas S2 y S3 suplementarias.

Como se esperaba en ambas condiciones de inducción la hiperproducción de YycF provocó un aumento en los niveles de expresión de su gen codificante *yycF* de 3,4 veces después de 5 min de inducción y de 5,1 veces por la inducción continuada. Además, se detectó un incremento de la expresión del gen *yycG* que codifica YycG en la estirpe JNR7/87[pRR] de 5,5 veces en la inducción transitoria durante 5 min y de 7,1 veces en la inducción continuada. Este resultado indicaba que el regulador YycF podría regular la síntesis de YycFG.

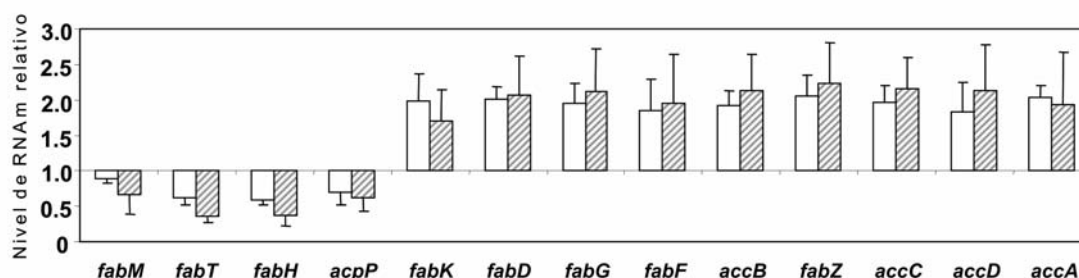
También, en ambas condiciones de inducción (Tablas S2 y S3), se observó en la estirpe portadora de pRR una expresión alterada de los genes implicados en la biosíntesis de los ácidos grasos (BAG) (Fig. 31A). Después de la inducción continuada esta alteración afectó a 12 de los 13 genes que están adyacentes en el cromosoma y que afectan a dicho proceso. Los niveles transcripcionales de los genes *fabT*, *fabH* y *acpP* aparecían reducidos y los de los genes *fabK*, *fabD*, *fabG*, *fabF*, *accB*, *fabZ*, *accC*, *accD* y *accA* (Sp0419-Sp0427) estaban incrementados. Estos resultados indicaron la existencia de dos operones: *acpP-fabTH-acpP* y *fabKDGF-accB-fabZ-accCDA*. Apoyando esta hipótesis se detectaron dos promotores putativos localizados delante de los operones (Fig. 31A). El primero de ellos, denominado P<sub>FabT</sub> se encuentra delante del gen *fabT* y contiene una región -10 y dos secuencias repetidas directas que corresponden a las secuencias de reconocimiento consenso de los reguladores YycF (Dubrac y Msadek, 2004). El segundo promotor denominado P<sub>FabK</sub> se encuentra delante del gen *fabK* y contiene, delante de la región -10 una repetición invertida, que es el sitio

de unión de FabT (Lu y Rock, 2006). Así, el regulador YycF podría regular la expresión de los genes implicados en la BAG controlando la expresión del represor FabT.

**A**



**B**



**Figura 31. Biosíntesis de los ácidos grasos en *S. pneumoniae*.** (A) Operón de los genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos. Las flechas en negro representan los genes cuyos niveles están incrementados a nivel de proteínas, como se detectó en el análisis proteómico. Se han representado los posibles promotores y las regiones palindrómicas en la región promotora de *fabT* y *fabK* a los que se une el represor transcripcional FabT. (B) Nivel de expresión de mRNA relativo de los genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos en las estirpes JNR7/87[pRR] comparada con la estirpe control JNR7/87[pLS1RGFP] durante la inducción transitoria durante 5 min (barras blancas) o durante la inducción continuada (barras rayadas). La longitud de las barras de error representa la desviación estándar de todas las medidas.

Además, en ambas condiciones de inducción se observaron alteraciones en genes cuyos productos están implicados en el transporte a través de la membrana celular, sugiriendo que la permeabilidad de la membrana estaba afectada en las células que sobreproducían YycF. Cabe destacar que después de 5 min de inducción, se observó en la estirpe JNR7/87[pRR] un descenso de la expresión del operón *piaBCDA* (Sp1864-Sp1872) implicado en el transporte de hierro (también llamado pit1BCDA), que juega un papel fundamental en la virulencia *in vivo* (Brown et al., 2001; Brown y Holden, 2002), correlacionando estos resultados con los obtenidos por la reducción de la expresión del gen *yycF*, situación en la que la expresión de este operón se encuentra inducida (Ng et al., 2003) (Tabla S2).

Por otra parte, se detectó una alteración en la expresión de genes implicados en el metabolismo y biosíntesis de la pared celular durante la inducción continuada (Tabla S3 suplementaria). Entre ellos se detectó sobreexpresión de los genes endo- $\beta$ -N-acetilglucosamidasas *lytB* (Sp0965), *pcsB* (Sp2216) y *bgl2* (Sp2021) que codifican respectivamente una endo- $\beta$ -N-acetilglucosamidasas; una hidrolasa esencial de pared celular (Mills et al., 2007), y una glicosil hidrolasa. Además, otros dos genes que codifican proteínas que contienen dominios LysM (Sp0107 y Sp2063) mostraron niveles elevados de transcripción después de la inducción. La mayoría de este tipo de proteínas cataliza la hidrólisis del péptidoglicano (Buist et al., 2008). El gen *mreC* (Sp2218), que está implicado en la biosíntesis de peptidoglicano, mostraba niveles de expresión disminuidos en la estirpe JNR7/87[pRR]. La alteración de la expresión de algunos de estos genes podría explicar los cambios morfológicos observados durante la inducción continuada (Fig. 30). *LytB*, es una endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa hidrolasa de neumococo y es la responsable de la separación de las células, de forma que la inactivación del gen *lytB* conduce a la formación de largas cadenas celulares (López et al., 2000). En *B. subtilis*, el gen *mreC* codifica una proteína esencial para la viabilidad y mantenimiento de la forma natural de la célula bacteriana (Van den Ent et al., 2006). Esta función del gen *mreC* podría aplicarse también a *S. pneumoniae*, de forma que la alteración celular observada en la estirpe JNR7/87[pRR] podría deberse a la disminución de expresión de este gen.

Estos resultados sugieren que varios genes implicados en la síntesis y metabolismo de la pared celular pueden estar directa o indirectamente regulados por el regulador de respuesta YycF, hipótesis apoyada por los resultados obtenidos cuando se disminuye el nivel de YycF (Ng et al., 2003), en los que se detecta un descenso del nivel transcripcional tanto del gen *lytB* como del gen *pcsB* en la estirpe R6. Además, la detección de cambios morfológicos en JNR7/87[pRR] sin efecto aparente en la replicación del DNA (Fig. 30), apoya una influencia de YycFG en la división celular.

Finalmente, después de la inducción continuada se observaron otras variaciones transcripcionales posiblemente debidas a una respuesta general al estrés fisiológico al que se sometían las células al sobreproducir un regulador. Apoyando esta hipótesis, el nivel transcripcional del operón de genes implicados en el choque térmico *hrcA*, *grpE* y *dnaK* (Sp0515-Sp0517) y de la chaperona de estrés *groEL* (Sp1906) se vio incrementado en la estirpe JNR7/87[pRR] con respecto a la estirpe control durante la

inducción continuada, habiendo sido detectado también este incremento durante la disminución de la expresión del gen *yycF* (Ng et al., 2003).

### 2. 3. Inducción de la transcripción del SDC cromosomal

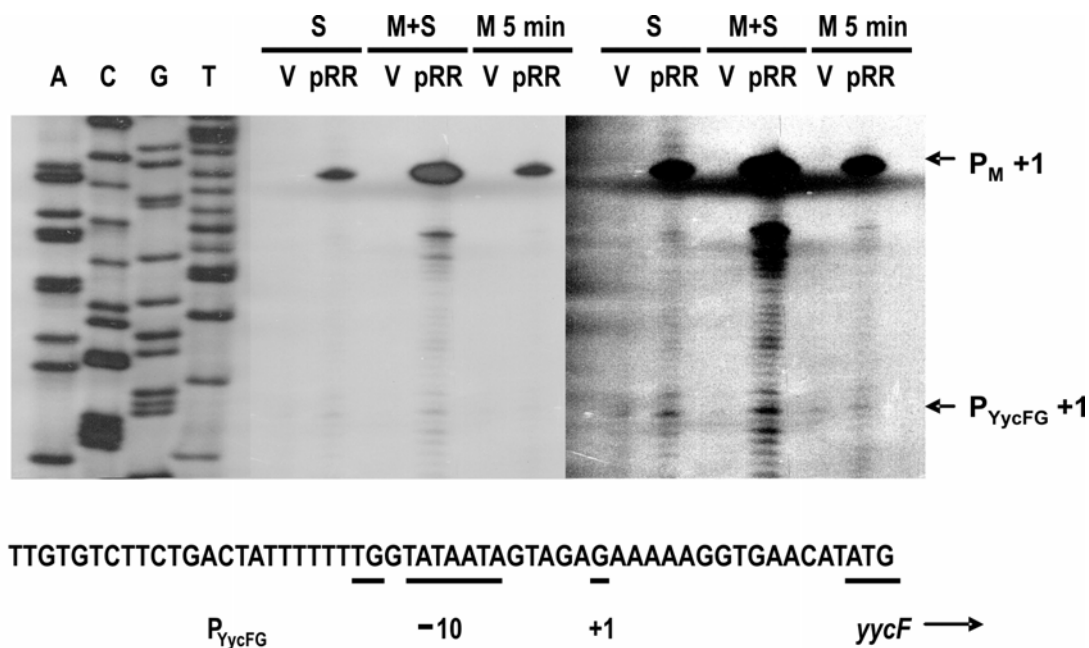
Los resultados obtenidos con el análisis de transcripcional realizado con microarrays habían mostrado niveles elevados de *yycG* en la estirpe JNR7/87[pRR], sugiriendo que la hiperexpresión del gen *yycF* codificado por el plásmido pRR provoca una inducción del operón cromosomal *yycFG*. Análisis de la extensión del cebador confirmaron esta hipótesis (Fig. 32). Para ello, se utilizaron muestras de RNA procedentes de cultivos sin inducir e inducidos transitoriamente durante 5 min y de forma continuada de las estirpes JNR7/87[pRR] y JNR7/87[pLS1RGFP].

En la reacción de retrotranscripción, 100 ng de RNA fueron añadidos a una reacción de cDNA a la que se le ha añadido 150  $\mu$ M de [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP (actividad específica 3000 Ci/mmol y concentración 1mCi/ml y el oligo específico 5'-TCCGAGATTGGTTTCTCA-3'.

El extremo 5' del RNA mensajero *yycF-gfp* sintetizado a partir del promotor  $P_M$  del plásmido (Nieto et al., 2001) sólo fue detectado en células portadoras del plásmido pRR, mientras que el extremo 5' del RNA mensajero del SDC *yycFG* cromosomal (Wagner et al., 2002) fue detectado en ambas estirpes. Corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, se identificó una secuencia promotora, con una región -35 TTGtgt que muestra 3 desviaciones de la secuencia canónica (TTGATA) y una región -10 extendida TGNTATAAT canónica, características del sitio de reconocimiento del factor  $\sigma$  vegetativo de bacterias gram positivas ( $P_{yycFG}$  en Fig.32), siendo la expresión a partir de este promotor mucho más elevada en la estirpe JNR7/87[pRR] que en la estirpe JNR7/87[pLS1RGFP] control. Estos resultados apoyan una autorregulación del sistema SDC YycFG mediada por el regulador de respuesta YycF.

La existencia de dos transcritos plasmídico y cromosomal conteniendo el gen *yycF* no nos había permitido obtener evidencias de una autorregulación de *yycF* mediante análisis de microarray y generaron unos análisis de extensión del cebador del extremo 5' del mRNA cromosomal con mucho fondo. Además, en la estirpe de *S. pneumoniae* R61, la sobreexpresión conjunta de los genes adyacentes *yycF*, *yycG* y *vicX* había permitido detectar por hibridación por Northern un mRNA que contenía los 3

genes, aunque dicho transcrito no fue detectado en células que sólo contenían el putativo operón cromosomal (Wagner et al., 2002; Ng et al., 2003). También, el análisis de microarray realizado por nosotros reveló que en la estirpe JNR7/87[pRR] inducida no se incrementaban los niveles de expresión de *vicX*.



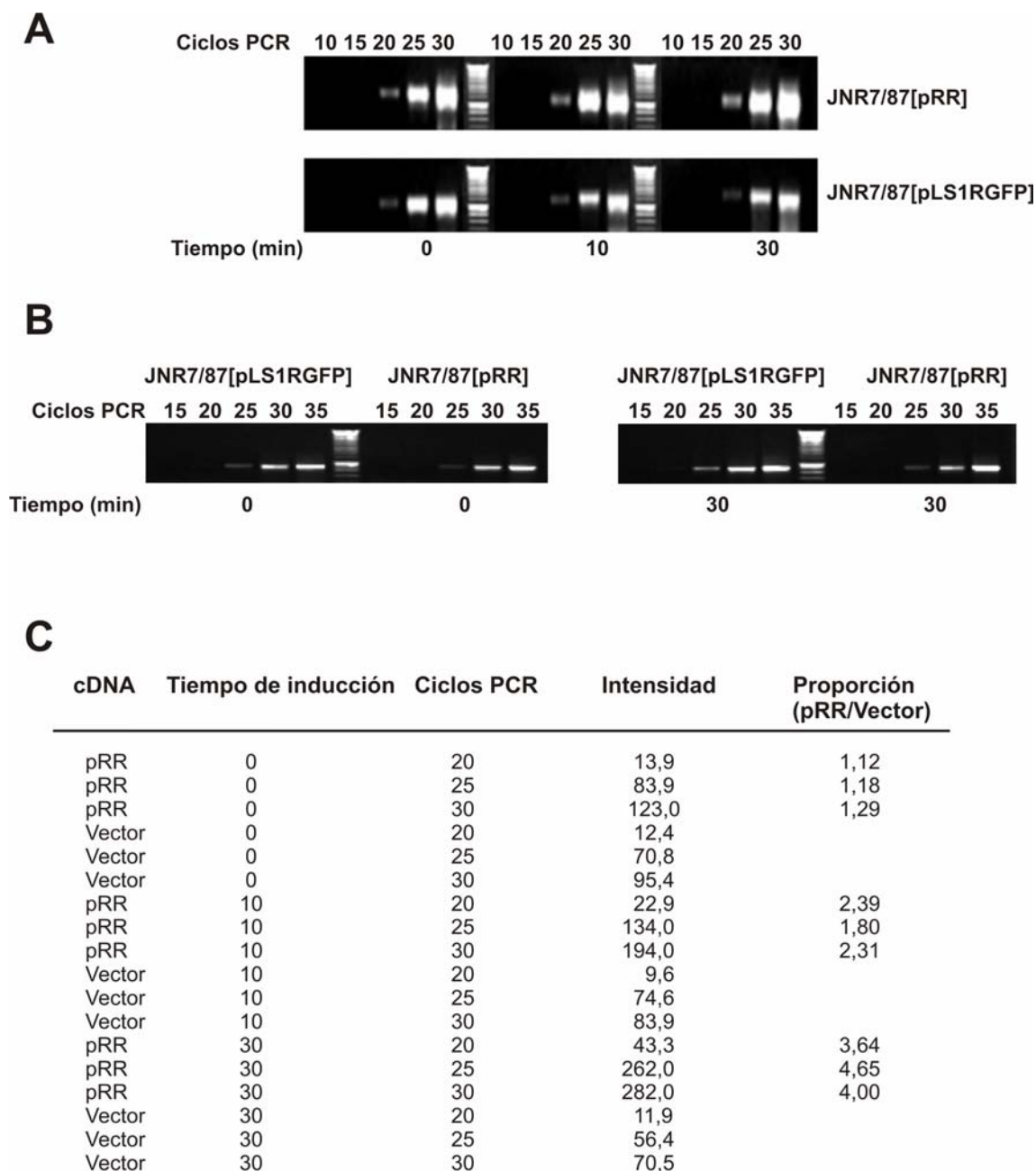
**Figura 32. Secuencia de la región 5' del operón *yycFG* y determinación del punto de inicio de la transcripción.** G, A, T y C hacen referencia a los dideoxinucleótidos añadidos a la reacción. Se muestra la secuencia de la cadena simple con los detalles más relevantes, como la región -10 del promotor, el punto de inicio de la transcripción señalado como el punto +1 y el codón de inicio ATC. Para la reacción de extensión del cebador se utilizó RNA total de cultivos crecidos en sacarosa, inducidos transitoriamente durante 5 minutos e inducidos continuamente, según se describe en Materiales y Métodos. Los cultivos que se utilizaron fueron la estirpe JNR7/87[pLS1RGFP] (V) y la estirpe JNR7/87[pRR] (pRR). P<sub>M</sub>+1 y P<sub>YycFG</sub>+1 son los fragmentos elongados correspondientes, respectivamente, a los sitios de inicio de la transcripción a partir del promotor plasmídico P<sub>M</sub> y a partir del promotor cromosomal P<sub>YycFG</sub>.

Por todo lo antedicho, y para confirmar niveles alterados del transcrito del sistema YycFG cromosomal provocados por la sobreproducción de YycF y la falta de efecto en la expresión de *vicX*, se recurrió a realizar un análisis de RT-PCR semicuantitativa.

Para ello, se utilizaron dos juegos de cebadores que generaron, a partir de preparaciones de RNA total, fragmentos de PCR que incluyeran los genes *yycF* e *yycG* o solamente el gen *vicX* (Fig. 33). Las muestras de RNA procedentes de cultivos de las estirpes JNR7/87[pRR] y JNR7/87[pLS1RGFP] crecidos en sacarosa e inducidos transitoriamente durante 10 y 30 minutos con maltosa fueron utilizadas para sintetizar cDNA utilizando como cebador reverso un cebador específico para el gen *yycG*



localizado en el cromosoma, evitando así las transcripciones del gen *yycF* procedentes del plásmido.

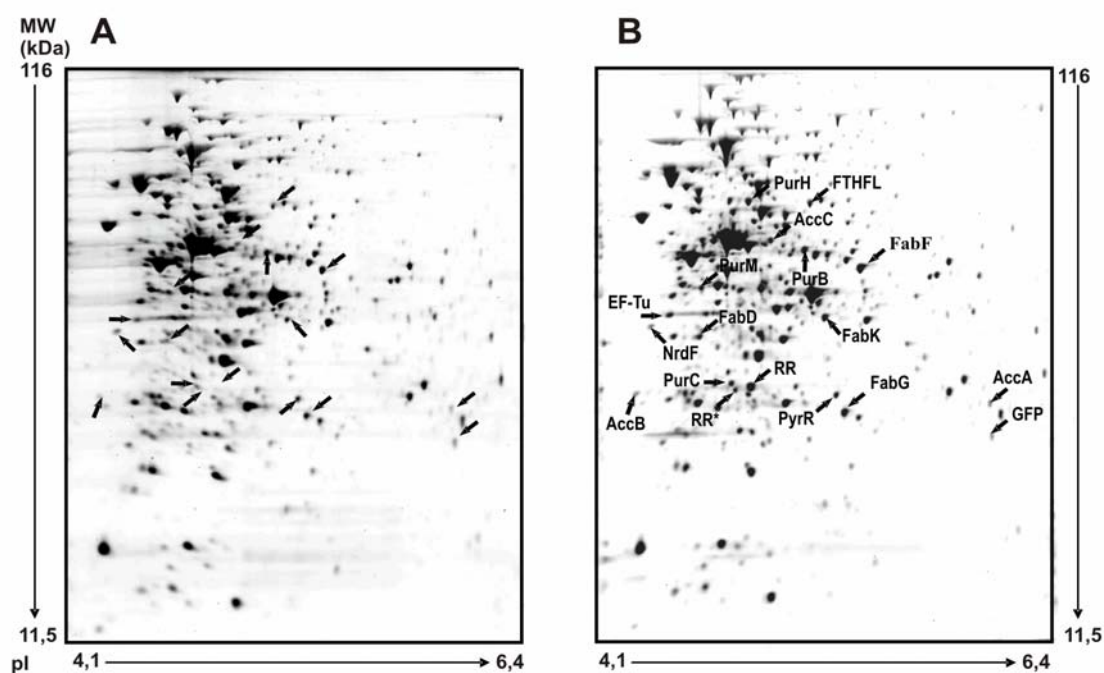


**Figura 33. Análisis por RT-PCR semicuantitativa de los genes *yycF*, *yycG* y *vicX*.** (A) Análisis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR procedentes de RNAs extraídos de los cultivos JNR7/87[pRR] y de la estirpe control JNR7/87[pLS1RGFP] crecidos en sacarosa (tiempo 0) o inducidos transitoriamente con maltosa durante 10 o 30 min. Se realizaron 10, 15, 20, 25 y 30 ciclos de amplificación por PCR. El producto amplificado corresponde al cDNA procedente de los genes *yycF* e *yycG* cromosómicos. (B) Análisis en gel de agarosa del producto amplificado correspondiente al cDNA procedente del gen *vicX* cromosómico. En este caso se ha utilizado RNAs extraídos de los cultivos JNR7/87[pRR] y estirpe control crecidos en sacarosa (tiempo 0) o inducidos transitoriamente durante 30 min con maltosa. Se realizaron 15, 20, 25, 30 y 35 ciclos de amplificación por PCR. (C) Cuantificación de los productos de RT-PCR mostrados en el panel A. La intensidad de las bandas fue medida, y la proporción fue calculada dividiendo los valores de intensidad de los productos de RT-PCR de JNR7/87[pRR] y JNR7/87[pLS1RGFP] en cada tiempo de inducción y en cada ciclo de PCR. La intensidad está medida en unidades arbitrarias.

Después de la transcripción reversa, el DNA bicistrónico procedente de los genes *yycF* e *yycG* fue amplificado por PCR (Fig. 33A). La cuantificación de los fragmentos de DNA amplificados detectados después de 20, 25 y 30 ciclos de PCR revelaron que, antes de la inducción (tiempo 0), el nivel de transcripción de los genes cromosomales *yycFG* fue similar en ambas estirpes analizadas ( $1,20 \pm 0,07$  veces de variación). Sin embargo, después de 10 y 30 min de inducción, los niveles de mRNA de los genes cromosómicos *yycFG* fueron  $2,17 \pm 0,26$  y  $4,10 \pm 0,42$  veces superior en la estirpe JNR7/87[pRR] que en la estirpe JNR7/87[pLS1RGFP]. Además, la inducción transitoria durante 10 y 30 min provocó un incremento de  $1,61 \pm 0,03$  y  $2,84 \pm 0,03$  veces el nivel del transcrito *yycFG* en la estirpe JNR7/87[pRR] pero no en la estirpe control (Fig. 33C). Estos resultados apoyaron que la transcripción a partir del promotor del operón cromosomal *yycFG* es inducida cuando se hiperproduce YycF. Aunque *vicX* ha sido propuesto para ser un tercer miembro del operón *yycFG*, no se observaron diferencias significativas en la transcripción de *vicX* en las cepas JNR7/87[pRR] y la cepa control después de 30 minutos de inducción con maltosa (Fig. 33B). Además, los intentos de utilizar la RT-PCR para la detección de un transcrito policistrónico que incluyera los genes *yycF*, *yycG* y *vicX* no tuvieron éxito. Por tanto, los resultados obtenidos confirman una cotranscripción de *YycFG* y no apoyan que *vicX* esté incluido en el mRNA del SDC.

## 2. 4. Análisis proteómico de *S. pneumoniae* después de la inducción del gen *yycF*

Para investigar la respuesta proteómica a niveles elevados de YycF en *S. pneumoniae*, cultivos de JNR7/87[pRR] y JNR7/87[pLS1RGFP] fueron inducidos continua o transitoriamente durante 5 o 30 minutos tal y como se indica en Materiales y Métodos. Los extractos de proteínas totales se prepararon a partir de tres cultivos independientes inducidos en cada una de las condiciones indicadas, y fueron analizados por fraccionamiento en geles 2D. Todas las preparaciones protéicas de *S. pneumoniae* mostraron unos perfiles 2D bien definidos, conteniendo aproximadamente 300 manchas protéicas distintas. Los perfiles representativos de las muestras examinadas después de la inducción continuada se muestran, como ejemplo, en la Fig. 34.



**Figura 34. Análisis proteómico de inducción continuada de las estirpes JNR7/87[pLS1RGFP] y JNR7/87[pRR].** Extractos proteicos de inducción continuada de las estirpes JNR7/87[pLS1RGFP] (A) y JNR7/87[pRR] (B) analizadas por electroforesis en gel de 2D, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las flechas indican los polipéptidos que están presentes y cuyas cantidades están incrementadas en la estirpe JNR7/87[pRR] comparadas con el control. La mancha correspondiente a la proteína GFP también está indicada.

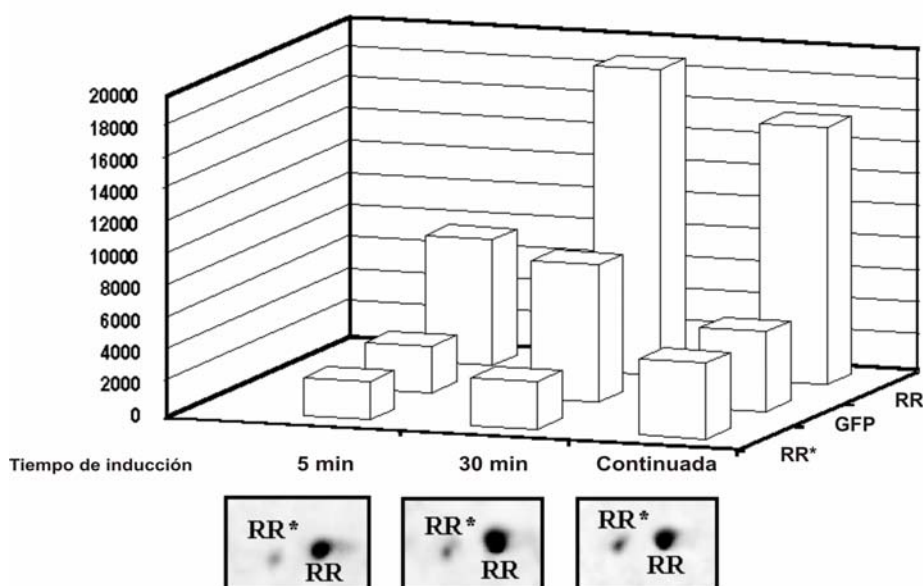
Se detectaron diez y siete proteínas, con expresión alterada en las células portadoras del plásmido pRR (nombradas en la Fig. 34). Dichas proteínas después de ser escindidas y digeridas con tripsina fueron identificadas por análisis de MALDI-TOF. Las proteínas identificadas, sus posibles funciones y sus niveles inferidos por la cuantificación de las manchas de proteínas, están resumidos en la Tabla 7.

Se observaron 17 proteínas que aumentan su nivel de expresión en las células portadoras del plásmido pRR en todas las condiciones de inducción

Dos de estas manchas corresponden al regulador de respuesta YycF. Estas manchas se identificaron sólo en los cultivos que contienen el plásmido pRR (manchas RR\* y RR in la Fig. 34) a todos los tiempos de inducción. La mancha más cargada positivamente (RR) es 3,3 veces y 6,9 veces más abundante que la mancha más cargada negativamente (RR\*) a los 5 y 30 min de inducción transitoria y 3,4 veces más abundante en la inducción continuada. El incremento de los niveles de la mancha RR (cuyos niveles máximos son alcanzados a los 30 min de inducción transitoria) fue similar al observado para la proteína GFP (Fig. 35).

Tabla 7. Proteínas afectadas por la inducción del gen *yycF*, detectadas por análisis proteómico.

Categoría funcional	Proteína <sup>1</sup>	Nivel de inducción <sup>2</sup>			Gen <sup>3</sup>	pI	Masa molecular
		5 min	30 min	Largo plazo			
Metabolismo de los ácidos grasos	FabK	2,25	2,20	2,00	Sp0419	5,12	34,156
	FabD	1,56	1,91	1,40	Sp0420	4,45	33,184
	FabG	2,39	2,57	1,84	Sp0421	5,34	25,739
	FabF	1,49	1,74	1,75	Sp0422	5,45	44,075
	AccB	2,05	2,02	1,93	Sp0423	4,17	17,023
	AccC	1,34	1,44	1,57	Sp0425	4,85	49,793
	AccA	2,74	2,51	1,80	Sp0427	6,31	28,230
Regulación	RR	>16,20	>39,22	>33,08	Sp1227	4,78	24,265
	RR*	>4,90	>5,65	>9,75	Sp1227	4,71	23,251
Biosíntesis de Purinas y Pirimidinas	PurC	1,22	1,57	1,87	Sp0044	4,64	27,043
	PurM	1,32	1,15	1,24	Sp0047	4,45	36,502
	PurH	1,39	1,21	1,62	Sp0050	4,75	56,316
	PurB	1,39	1,65	1,17	Sp0056	5,03	49,617
	PyrR	1,29	1,39	0,99	Sp1278	5,16	19,597
	NrdF	1,24	1,61	0,98	Sp1180	4,18	36,961
Metabolismo intermediario central	FTHFL	1,42	1,81	1,65	Sp1489	5,09	59,806
Síntesis de proteínas	EF Tu	1,98	1,86	1,30	Sp1804	4,60	43,943



**Figura 35.** Nivel de expresión relativo de las proteínas GFP y YycF en la estirpe de *S. pneumoniae* JNR7/87[pRR] después de inducciones transitorias durante 5 y 30 min o de una inducción continuada. Las manchas proteicas correspondientes a las dos isoformas del YycF (RR y RR\*) y a la proteína fluorescente verde (GFP) fueron cuantificados. Se han representado el valor medio de la intensidad de las manchas procedentes de tres cultivos independientes y se han expresado en unidades arbitrarias. Para cada tiempo de inducción se muestra una imagen de gel 2D en el que se encuentran las dos manchas correspondientes a las dos isoformas de YycF.

Entre las proteínas con expresión alterada se detectaron el factor de elongación Tu (Sp1489), cuatro proteínas implicadas en la biosíntesis de purinas (PurCMHB; Sp0044, Sp0047, Sp0050, Sp0056) y la formato tetrahidrofolato ligasa (FTHFL, Sp1229), que genera el sustrato para PurH. El incremento de la proteína reguladora del operón de las pirimidinas (PyrR, Sp1275) y de la subunidad beta de la 2-ribonucleósido-difosfato reductasa (NrdF, Sp1180) también se han detectado en la estirpe JNR7/87[pRR], pero sólo después de 5 y 30 minutos de inducción.

Finalmente, se identificaron siete proteínas implicadas en la biosíntesis de ácidos grasos (AccABC, FabKDGF; Sp0419-Sp0425, Sp0427) (Fig. 31B) que aparecían sobreexpresadas en la estirpe portadora de pRR en todas las condiciones de inducción. Este resultado confirma el efecto observado con el análisis de microarrays, en el cual se había detectado un incremento en los niveles de expresión de sus genes codificantes. Además, el análisis de microarrays había mostrado una alteración de los niveles de expresión de todos los genes implicados en la biosíntesis de los ácidos grasos a excepción de la desaturasa FabM.

## 2. 5. Efecto de la inducción del gen *yycF* en la composición de ácidos grasos de membrana

Tanto el análisis del proteoma como del transcriptoma, señalaban un incremento en la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos, *fabK*, *fabD*, *fabG*, *fabF*, *accB*, *fabZ*, *accC*, *accD*, y *accA* (Sp0419 a Sp0427) provocada por la sobreexpresión de YycF, sugiriendo la existencia de un cambio en la composición de membrana. Por ello, se procedió a analizar la composición de membrana tanto de la estirpe control (JNR7/87[pLS1RGFP]) como de la estirpe JNR7/87[pRR] por cromatografía de gases-espectrometría de masas (ver Materiales y Métodos) después de someter a las estirpes a una inducción continuada. Los resultados se muestran en la Tabla 8. Las membranas de *S. pneumoniae* están compuestas, principalmente, por cadenas de ácidos grasos de 16 y 18 carbonos, tanto saturados como insaturados (Marrakchi et al., 2002). En la estirpe control, la proporción detectada de ácidos grasos de 18 carbonos ( $C_{18:0}$ ,  $C_{18:1\Delta 9}$ ,  $C_{18:1\Delta 11}$  y  $C_{18:1\Delta 13}$ ) y de ácidos grasos de 16 carbonos ( $C_{16:0}$ ,  $C_{16:1\Delta 7}$ ,  $C_{16:1\Delta 9}$  y  $C_{16:1\Delta 11}$ ) fue de 1,16. Sin embargo, la membrana de la estirpe hiperexpresora del gen *yycF* mostraba un incremento en la proporción de ácidos grasos de 18 carbonos con respecto a los de 16 carbonos de 1,83. Este incremento también observó cuando se comparaban por separado los ácidos grasos saturados e insaturados (Tabla 8). La proporción relativa de ácidos grasos saturados e insaturados fue similar tanto en la estirpe control como en la estirpe JNR7/87[pRR], obteniéndose unos valores de 1,10 y 1,12 respectivamente. Estos datos apoyan la conclusión de que la sobreproducción de YycF afecta a la composición de membrana.

**Tabla 8. Composición de ácidos grasos en extractos totales de lípidos de membrana de las estirpes JNR7/87[pLS1RGFP] y JNR7/87[pRR].**

Ácidos grasos o proporción	Proporción total de los ácidos grasos en las estirpes indicadas <sup>b</sup>	
	JNR7/87[pLS1RGFP]	JNR7/87[pRR]
AGSs <sup>a</sup>		
<i>n</i> -12:0	0,68±0,26	0,19±0,06
<i>n</i> -14:0	3,94±0,45	2,28±0,51
Anteiso-15:0	0,11±0,01	0,12±0,03

<i>n</i> -16:0	32,10±1,76	29,83±2,48
Iso-17:0	0,06±0,04	0,28±0,03
Anteiso-17:0	0,63±0,07	0,59±0,03
<i>n</i> -18:0	11,30±1,80	15,06±0,76
ΣAGSs	48,82±4,39	48,35±3,90
18:0/16:0	0,35±0,04	0,50±0,01
AGIs <sup>a</sup>		
<i>n</i> -14:1	0,34±0,10	0,09±0,04
<i>n</i> -16:1Δ7	2,11±0,46	0,76±0,10
<i>n</i> -16:1Δ9	9,49±1,99	3,35±0,42
<i>n</i> -16:1Δ11	1,23±0,30	0,94±0,24
Σ16:1	12,83±2,75	5,05±0,76
<i>n</i> -18:1Δ9	5,33±0,72	5,11±0,28
<i>n</i> -18:1Δ11	33,78±1,76	41,04±2,30
<i>n</i> -18:1Δ13	1,71±0,25	2,77±0,16
Σ18:1	40,82±2,73	48,92±2,74
ΣAGIs	53,65±5,48	53,97±3,50
18:1/16:1	3,18±0,49	9,68±0,93

<sup>a</sup> AGSs, ácidos grasos saturados; AGIs, ácidos grasos insaturados.

<sup>b</sup> Se han mostrado valores medios y desviaciones estándar de seis experimentos diferentes.

## 2. 6. Hiperexpresión del regulador de respuesta *yycF* en la estirpe de *S. pneumoniae* deficiente en *yycG* y la hiperexpresión de los genes *yycFG* en *S. pneumoniae*

Una vez detectada la alteración en la biosíntesis de ácidos grasos, para comprobar a que forma del regulador YycF (fosforilada o no fosforilada) era debida este efecto, se procedió a generar estirpes mutantes de *S. pneumoniae* (i) que sobreexpresara el SDC YycFG y (ii) carente de la histidina quinasa YycG y que sobreexpresara YycF.

Para ello, se realizaron las siguientes construcciones. Los genes *yycFG* fueron insertados entre el promotor P<sub>M</sub> y el gen reportero *gfp* de pLS1RGFP, generando el plásmido pRRHK (ver detalles en Materiales y Métodos). En esta construcción el gen

*gfp* se encuentra a continuación de los genes *ycyFG*, constituyendo la fusión transcripcional  $P_{M-ycyFG}-gfp$ . El plásmido resultante, pRRHK fue construido en la estirpe R6 y posteriormente transferido a la estirpe JNR7/87. También, se interrumpió en la estirpe JNR7/87 el gen cromosómico *ycyG* por inserción de un gen *kan* que confiere resistencia a kanamicina (Sung et al., 2001). En esta estirpe se introdujo por transformación genética el plásmido pRR generándose la estirpe JNR7/87(*ycyG::kan*)[pRR] (ver Materiales y Métodos).

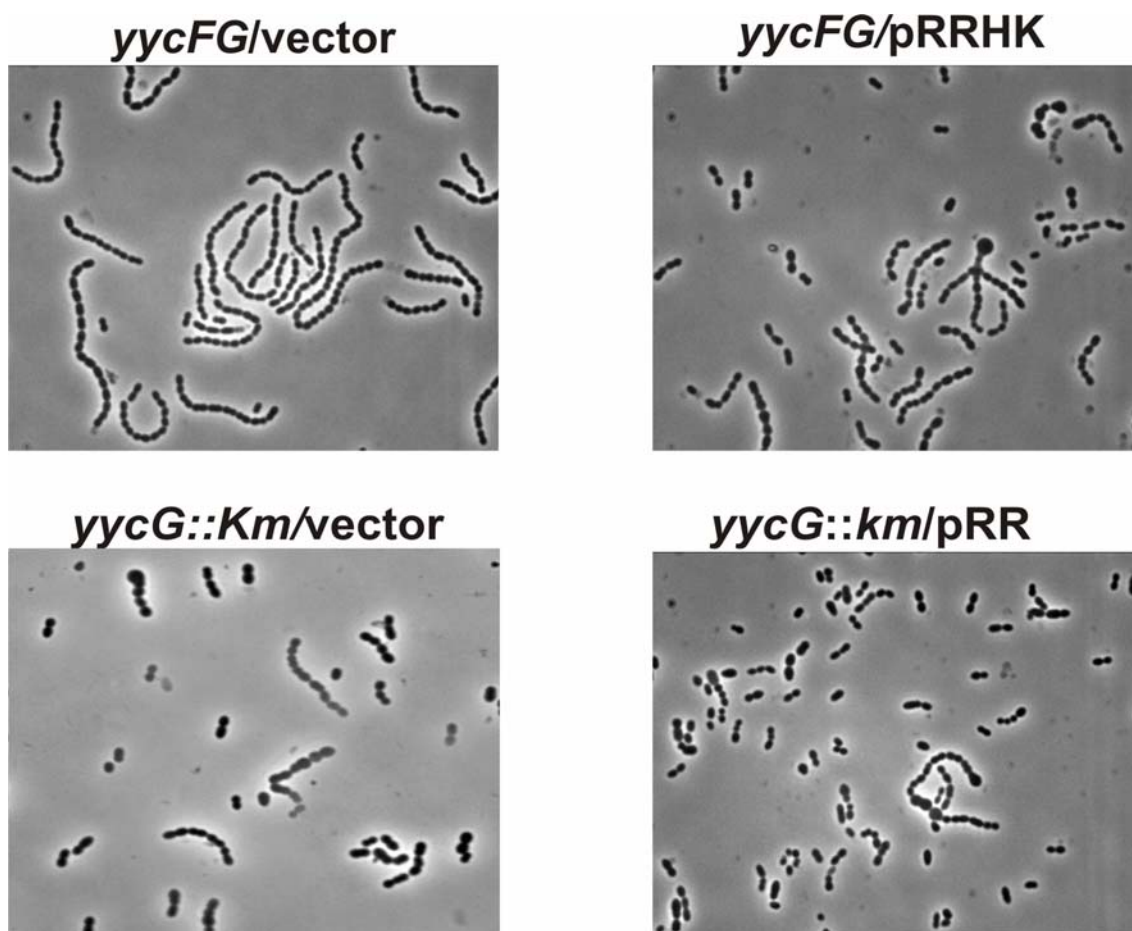
El patrón de crecimiento y la morfología de las estirpes JNR7/87(*ycyG::kan*)[pLS1RGFP] y JNR7/87(*ycyG::kan*)[pRR] carentes de YcyG y de la estirpe JNR7/87[pRRHK] sobreproductora de YcyFG fueron comparados con los que mostraban la estirpe control y la estirpe silvestre portadora del plásmido pRR. Ninguna de las estirpes analizadas mostró diferencias significativas en su patrón de crecimiento en medio conteniendo sacarosa o durante su inducción de forma transitoria (datos no mostrados). En los cultivos inducidos de forma continuada se detectó una alteración de crecimiento en la estirpe JNR7/87(*ycyG::kan*)[pRR], entrando en fase estacionaria a una menor densidad óptica (datos no mostrados), por lo que no pudo ser utilizada con esta estirpe esta inducción.

Al analizar la expresión de GFP durante la inducción transitoria entre la estirpe JNR7/87[pLS1RGFP] como de las estirpes JNR7/87(*ycyG::kan*)[pRR] y JNR7/87[pRRHK], se observó que a 10 y 15 min de inducción todas estirpes se encontraban en la fase exponencial de la inducción, mientras que a los 30 min se encontraban en fase estacionaria, siendo éstos los puntos seleccionados para los experimentos posteriores en esta estirpe. En el caso de la estirpe JNR7/87 [pRRHK], además de la inducción transitoria se realizaron cultivos de inducción continuada.

Para analizar la morfología celular de las estirpes JNR7/87[pLS1RGFP], JNR7/87[pRRHK], JNR7/87(*ycyG::kan*)[pLS1RGFP] y JNR7/87(*ycyG::kan*)[pRR], éstas fueron inducidas transitoriamente durante 60 min con maltosa y posteriormente analizadas por microscopía de contraste de fase (Fig.36) (ver Materiales y Métodos). El análisis mostró que, tanto la sobreexpresión de los genes *ycyFG*, como la inactivación del gen cromosómico *ycyG* provocaban alteraciones en la morfología de las células, no observándose esta alteración en la estirpe vector JNR7/87[pLS1RGFP]. Estas morfologías anómalas parecen estar relacionadas con alteraciones en la división celular, posiblemente debido a la alteración de la proteína PcsB, una hidrolasa esencial de la pared celular, que está implicada en la separación de las células divididas, y que se



encuentra afectada tanto por la hiperexpresión como por la reducción de la expresión del gen *yycF* (Ng et al., 2003; Mohedano et al., 2005).

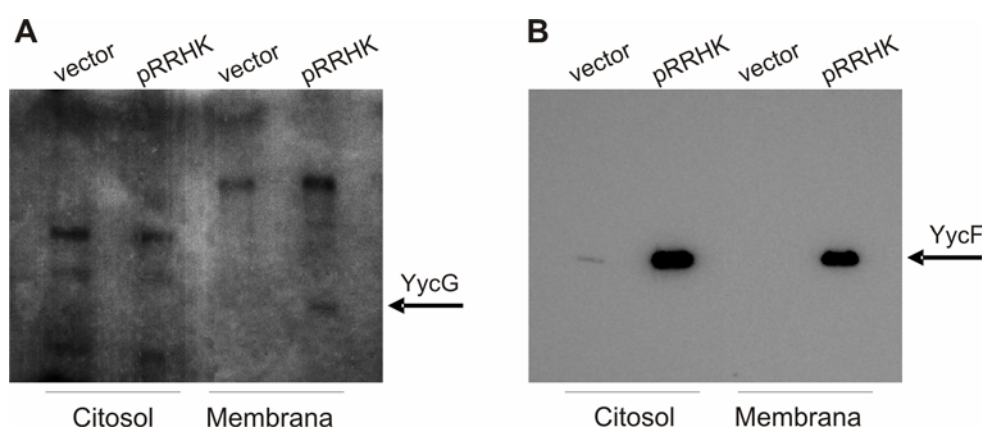


**Figura 36. Microscopía de contraste de fase de las estirpes de *S. pneumoniae*.** Los cultivos de *S. pneumoniae* JNR7/87[pLS1RGFP] (*yycFG*/vector), JNR7/87[pRRHK] (*yycFG*/pRRHK), JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] (*yycG::kan*/pRR) y la estirpe JNR7/87(*yycG::kan*)[pLS1RGFP] (*yycG::kan*/vector) fueron inducidas transitoriamente durante 60 min con maltosa y analizadas por microscopía de contraste de fase, detectando células con morfología anómala en todas las estirpes a excepción de la estirpe vector JNR7/87[pLS1RGFP].

## 2. 7. Ensayo de autofosforilación de la histidina quinasa YycG en vesículas de membrana

Para comprobar que en la estirpe JNR7/87[pRRHK] la hiperproducción del gen *yycG* da lugar a una proteína funcional activa, hemos realizado ensayos de autofosforilación, tanto de la fracción correspondiente a vesículas de membrana como de la fracción proteica citosólica de las estirpes JNR7/87[pRRHK] y de la estirpe control deficiente en el gen cromosómico *yycG*, JNR7/87(*yycG::kan*)[pLS1RGFP]. Para ello, estas dos estirpes se indujeron transitoriamente durante 45 min con maltosa,

procediendo posteriormente a separar las fracciones correspondientes a las vesículas de membrana y proteínas citosólicas, tal y como se indica en Materiales y Métodos. Para la realización del ensayo de autofosforilación se utilizaron 80 µg de proteínas de cada fracción y se analizaron por duplicado en geles del 10 al 20% PAA-SDS. Además, con el objeto de evaluar la sobreproducción de YycF en la estirpe JNR7/87[pRRHK], uno de los geles fue electro-transferido a una membrana de PVDF e hibridado con anticuerpos policlonales contra la proteína YycF, como se indica en Materiales y Métodos. En el gel correspondiente al ensayo de autofosforilación se detectó, en la fracción de membrana de la estirpe JNR7/87[pRRHK] (hiperexpresora del gen *yycG*), una banda que no fue observada en la estirpe JNR7/87(*yycG::kan*)[pLS1RGFP]. Esta banda corresponde a una masa molecular de aproximadamente de 52 kDa, concordante con la esperada para YycG de 51.7 kDa (Fig. 37). En la membrana hibridada con los anticuerpos frente a la proteína YycF se detectó, en la estirpe JNR7/87[pRRHK], una banda correspondiente a la proteína YycF tanto en la fracción citosólica como en la fracción de membrana, ya que parte de las proteínas citosólicas pueden quedar encerradas en las vesículas de membrana. En la fracción citosólica de la estirpe JNR7/87(*yycG::kan*)[pLS1RGFP] se detectó una banda tenue correspondiente a la proteína YycF codificada por el gen cromosómico (Fig. 37).



**Figura 37. Ensayo de actividad de autofosforilación y detección de la proteína YycF de las estirpes de *S. pneumoniae*.** (A) 80 µg de las preparaciones de vesículas de membrana y fracciones citosólicas de las estirpes JNR7/87(*yycG::kan*)[pLS1RGFP] (Vector) y JNR7/87[pRRHK] (pRRHK) fueron incubadas durante 10 min a 30°C con [ $\gamma$ - $^{32}$ P] y las proteínas separadas en geles del 10 al 20% PAA-SDS. La banda visible en la fracción de membrana de la estirpe JNR7/87[pRRHK] y que no se observa en la estirpe control corresponde a la proteína autofosforilada YycG. (B) Membrana de PVDF hibridada con anticuerpos frente a la proteína YycF.

## 2. 8. Análisis transcripcional de *S. pneumoniae* después de la inducción del gen *yycF* en la estirpe deficiente en *yycG* cromosómico y en la estirpe hiperexpresora de los genes *yycFG*

Se realizó un análisis transcripcional global utilizando microarrays de las estirpes JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] y JNR7/87 [pRRHK] en comparación con la estirpe control JNR7/87[pLS1RGFP], empleando RNA de cultivos inducidos transitoriamente durante 10 y 30 min. Además, también se evaluó el nivel de los mRNA de la estirpe JNR7/87[pRRHK] en comparación con la estirpe control empleando cultivos sometidos a inducción continuada (ver Materiales y Métodos). Como réplicas biológicas se utilizaron tres cultivos independientes de cada estirpe y los datos promedios fueron obtenidos por la media de 12 muestras por cada gen.

Una lista completa de los genes afectados a nivel transcripcional y su clasificación funcional se encuentran en las tablas 9 y S4. Lo primero que se realizó fue una comparación indirecta entre las estirpes JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] y JNR7/87[pRRHK] a los diferentes tiempos de inducción, ya que ambas estirpes están comparadas con la estirpe control JNR7/87[pLS1RGFP], observándose que la mayoría de los genes afectados transcripcionalmente se encuentran relacionados con la composición de ácidos grasos de membrana. Se volvió a detectar la expresión alterada de 12 de los 13 genes implicados en la biosíntesis de los ácidos grasos en la estirpe JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] en comparación con la estirpe JNR7/87[pRRHK](Tabla 9). Los niveles de mRNA de la unidad transcripcional compuesta por los genes *fabK*, *fabD*, *fabG*, *fabF*, *accB*, *fabZ*, *accC*, *accD* y *accA* (Sp0419-Sp0427) se vieron incrementados durante la inducción del gen *yycF* en la estirpe deficiente del gen cromosómico *yycG* (Fig. 38B), tanto a los 10 como a los 30 min de inducción. También se detectó un incremento en ambos tiempos de la expresión de los operones *glcF*, *glcO* y *glpK* (Sp2184-86) implicados en el metabolismo de los fosfolípidos y proteínas ancladas a la pared celular (Sp0462-464). Otro de los genes cuyo mRNA se vió aumentado fue *vicX*, situado a continuación del gen *yycG* en la estirpe JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR]. Este resultado es debido posiblemente, a la transcripción en el mutante, procedente del promotor del gen *kan* localizado delante del gen *vicX*.

Del mismo modo, hemos encontrado afectados otros genes cuando comparamos las estirpes hiperexpresoras con la estirpe control (JNR7/87 [pLS1RGFP]) (Tabla S4).

Los genes endo- $\beta$ -N-acetilglucosamida (*lytB*; Sp0965), *pcsB* (Sp2216) y otros dos genes que contienen dominios LysM (Sp0107 y Sp2063) tenían niveles mayores de expresión en la estirpes JNR7/87[pRRHK] y JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] comparadas con la estirpe control, coincidiendo estos resultados con los obtenidos por la hiperexpresión de YycF (Mohedano et al., 2005). Los genes *mreC* (Sp2218) y *mreD* (Sp2217) que están implicados en la biosíntesis de peptidoglicano, tienen sus niveles de expresión disminuidos tanto en la estirpe JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] como en la estirpe JNR7/87[pRRHK], detectándose menores niveles de expresión conforme aumenta el tiempo de inducción. Lo mismo ocurre con los genes implicados en degradación de proteínas (Sp2223, Sp2224 y Sp2225), que también han sido detectados por la hiperexpresión de *yycF* en la estirpe JNR7/87 (Mohedano et al., 2005).

Los genes implicados en sistemas de transporte ABC (Sp2219, Sp2220 y Sp2221) poseen sus niveles de expresión disminuidos tanto a los 30 min de inducción transitoria como en la inducción continuada, siendo los niveles de represión similares en ambas estirpes.

En la tabla 9 se encuentran recogidos los genes cuya expresión era diferente en las estirpes JNR/87(*yycG::kan*)[pRR] y JNR7/87[pRRHK]. Se observaron distintos patrones de diferencias: (i) genes sólo alterados en la estirpe JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR], como los genes implicados en la BAG (ii) Genes inducidos en la estirpe JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] y reprimidos en la estirpe JNR7/87[pRRHK].

En la tabla S4 aparecen recogidos los genes afectados de forma similar en las estirpes JNR/87(*yycG::kan*)[pRR] y JNR7/87[pRRHK]). Entre ellos se incluyen los genes *pcsB* (Sp2216), *lytB* (Sp0965), los genes con dominios LysM (Sp0107 y Sp2063) implicados en la síntesis y metabolismo de la pared celular y los genes *mreC* (Sp2218) y *mreD* (Sp2217) implicados en la biosíntesis de peptidoglicano.

Nuestros resultados sugieren que los genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos de membrana pueden estar directa o indirectamente regulados por la proteína YycF sin fosforilar, cuando se encuentra en niveles superiores a los de la histidina quinasa YycG, no detectándose cuando ambos genes se encuentran en el mismo nivel de expresión (proteína fosforilada). Sin embargo, los genes implicados en la síntesis y metabolismo de la pared celular pueden estar directa o indirectamente afectados tanto por la alteración del regulador como de la histidina quinasa, hipótesis que se ha visto corroborada por los resultados obtenidos cuando se disminuye el nivel de YycF (Ng et al., 2003), en los que se detecta un descenso del nivel transcripcional tanto del gen *lytB*

como del gen *pcsB* en la estirpe R6. En nuestro caso, nosotros no hemos detectado, en ninguno de los mutantes del SDC YycFG de la estirpe capsulada JNR7/87, alteraciones en la expresión del gen *pspA*, mientras que, Ng y cols. (2005) detectaron alteración en la expresión del gen *pspA* al disminuir la expresión de YycF en la estirpe no capsulada R6.

**Tabla 9. Genes con patrón de expresión diferente entre las estirpes JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] y JNR7/87[pRRHK].**

Categoría funcional	TIGR4 n°	Producto génico (gen)	JNR7/87 <i>yycG::kan</i> [pRR]		JNR7/87[pRRHK]		
			10 min	30 min	10 min	30 min	Inducción continuada
Metabolismo ácidos grasos	Sp0417	3-Oxoacil-ACP-sintetasa III ( <i>fabH</i> )	0,42±0,07	0,57±0,15	0,86±0,18	0,78±0,08	0,75±0,10
	Sp0418	Proteína transportadora de acilo ( <i>acpP</i> )	0,58±0,01	0,67±0,24	0,87±0,15	0,61±0,06	0,87±0,27
	Sp0419	Enoil-ACP-reductasa ( <i>fabK</i> )	1,64±0,25	1,76±0,37	0,97±0,10	0,78±0,13	0,87±0,09
	Sp0420	Malonil-CoA-transacilasa ( <i>fabD</i> )	1,76±0,31	1,91±0,56	0,89±0,04	0,84±0,04	0,76±0,16
	Sp0421	3-Oxoacil-ACP-reductasa ( <i>fabG</i> )	1,91±0,57	2,00±0,52	0,81±0,04	0,85±0,10	0,80±0,03
	Sp0422	3-Oxoacil-ACP-sintetasa II ( <i>fabF</i> )	2,15±0,56	2,19±0,60	0,78±0,11	0,83±0,11	0,78±0,12
	Sp0423	Acetil-CoA carboxilasa ( <i>accB</i> )	2,09±0,37	2,06±0,35	0,81±0,06	0,73±0,04	0,86±0,06
	Sp0424	3-hidroxiacil-ACP-dehidratasa ( <i>fabZ</i> )	2,24±0,4	2,28±0,26	0,88±0,11	0,86±0,08	0,81±0,12
	Sp0425	Acetil-CoA carboxilasa, biotina carboxilasa ( <i>accC</i> )	2,28±0,63	2,60±0,42	0,83±0,06	0,88±0,07	0,81±0,09
	Sp0426	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad β ( <i>accD</i> )	2,44±0,67	2,58±0,47	0,85±0,06	0,86±0,18	0,76±0,17
	Sp0427	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad α	2,25±0,48	2,65±0,35	0,91±0,11	0,90±0,06	0,85±0,17

		(accA)					
Envuelta celular	Sp2184	Transportador de glicerol ( <i>glcF</i> )	2,91±0,70	1,79±0,76	0,32±0,20	0,97±0,10	1,00±0,11
	Sp2185	α-glicerofosfato oxidasa ( <i>glcO</i> )	2,12±0,01	1,94±0,77	0,22±0,12	1,13±0,21	1,13±0,02
	Sp2186	Glicerol quinasa ( <i>glpK</i> )	2,30±0,11	2,21±1,08	0,36±0,22	1,17±0,02	0,80±0,11
	Sp0462 <sup>1</sup>	Familia de proteínas ancladas a la superficie celular	1,42±0,27	2,09±0,42	0,22±0,14	0,24±0,02	0,32±0,05
	Sp0463 <sup>1</sup>	Familia de proteínas ancladas a la superficie celular	1,65±0,01	2,24±0,29	0,26±0,14	0,23±0,02	0,40±0,03
	Sp0464 <sup>1</sup>	Familia de proteínas ancladas a la superficie celular	1,41±0,05	2,28±0,58	0,43±0,10	0,31±0,02	0,37±0,05
Regulación	Sp0416	Regulación de la biosíntesis de ácidos grasos ( <i>fabT</i> )	0,48±0,12	0,67±0,2	0,76±0,11	0,87±0,06	0,7±0,18
Otros	Sp1225	<i>VicX</i>	2,56±1,10	2,46±0,17	1,42±0,99	1,11±0,23	1,27±0,42

<sup>1</sup> Genes presentes en la TIGR4 pero no en el genoma R6.

## 2. 9. Análisis proteómico de *S. pneumoniae* después de la inducción del gen *yycF* en la estirpe deficiente en *yycG* cromosómico y en la estirpe hiperexpresora de los genes *yycFG*

Para investigar la respuesta proteómica de los niveles elevados de la proteína YycF en ausencia de YycG o en presencia de YycG hiperproducida, las estirpes JNR7/87[pRRHK] y JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] fueron inducidas transitoriamente durante 10 y 30 min con maltosa. Además, la estirpe JNR7/87[pRRHK] fue sometida a inducción continuada con maltosa. Los extractos de proteínas totales se prepararon a partir de tres cultivos inducidos diferentes en cada una de las condiciones, y fueron analizados por fraccionamiento en geles de dos dimensiones (2D). Todas las preparaciones celulares de *S. pneumoniae* mostraron unos perfiles 2D bien definidos.

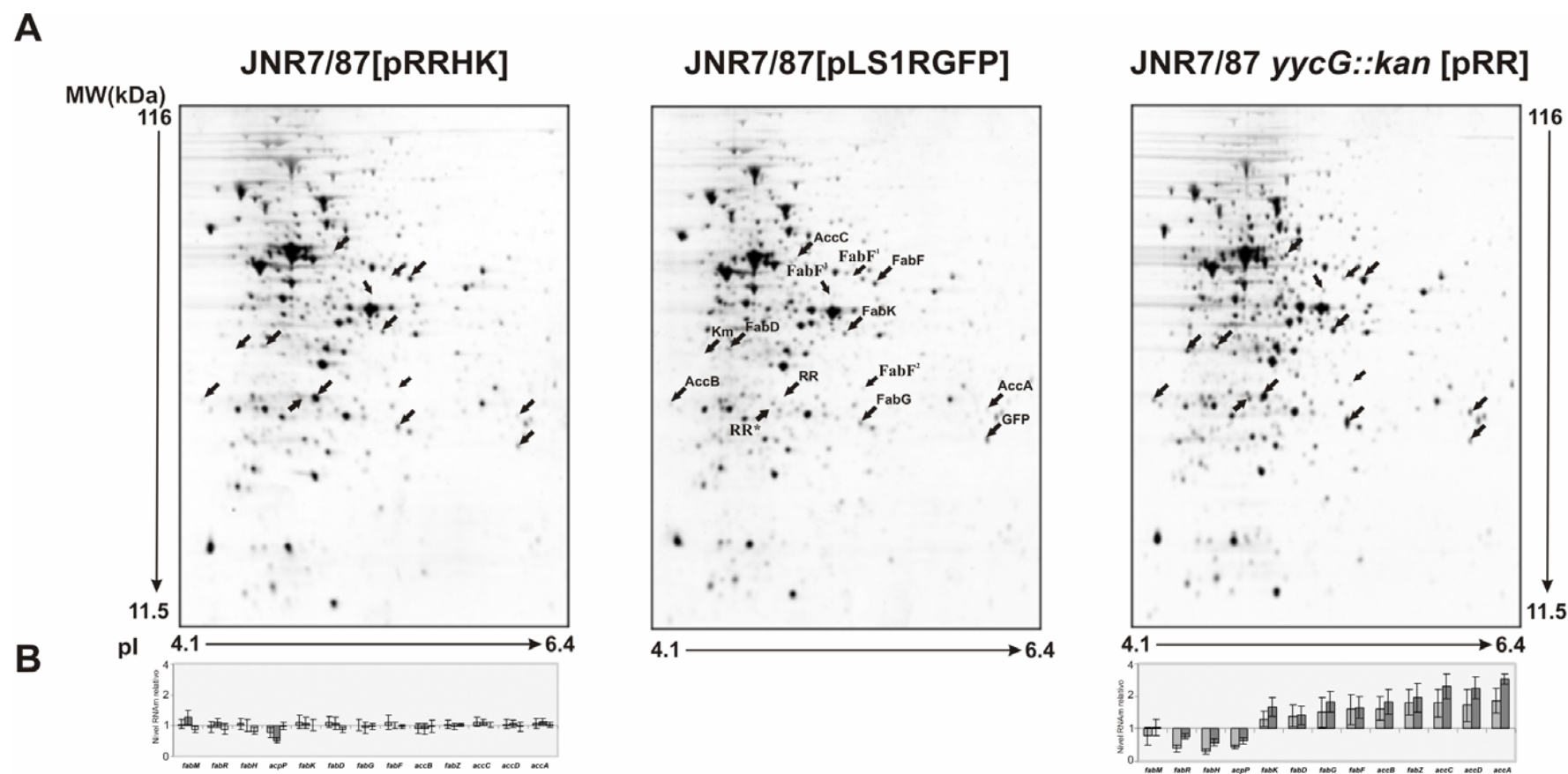
Las proteínas fueron cuantificadas y aquellas que mostraban niveles alterados respecto a la estirpe control JNR7/87[pLS1RGFP] fueron identificadas.

**Tabla 10. Proteínas afectadas por la inducción del gen *yycF* en una estirpe deficiente en el gen *yycG* o por la inducción de los genes *yycFG*, detectadas por análisis proteómico.**

Mancha	10 min inducción			30 min inducción			HK <sup>-</sup>	Inducción continuada
	Proporción HK <sup>-</sup> pRR/V	Proporción pRRHK/V	Proporción HK <sup>-</sup> pRR/pRRHK	Proporción HK <sup>-</sup> pRR/V	Proporción pRRHK/V	Proporción pRR/pRRHK		Proporción pRRHK/V
AccC	1,90	0,76	2,50	2,56	1,15	2,22		1,18
FabF	1,91	1,10	1,74	2,33	0,99	2,35		1,01
FabK	2,22	1,08	2,05	2,22	1,04	2,22		1,07
FabD	1,99	1,13	1,76	2,79	1,08	2,58		0,90
AccB	1,85	1,11	1,67	2,00	1,01	1,99		1,17
FabG	2,48	1,11	2,23	2,82	1,10	2,56		1,00
AccA	2,96	1,30	2,28	2,15	0,88	2,44		0,85
FabF <sup>1</sup>	3,53	1,36	2,60	2,78	1,06	2,62		0,68
FabF <sup>2</sup>	1,63	1,07	1,53	2,73	1,26	2,17		1,60
FabF <sup>3</sup>	1,99	1,06	1,99	2,40	1,31	1,83		1,33
RR	>16,4	>18,2	0,90	>20,6	>25,2	0,81		>32,7
RR <sup>*</sup>	>45,4	>41,3	1,10	>68,4	>58,6	0,85		>74,8

La denominación de las estirpes en esta tabla corresponden a JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] como HK<sup>-</sup>[pRR], la estirpe JNR7/87[pRRHK] como pRRHK y la estirpe JNR7/87[pLS1RGFP] como V.

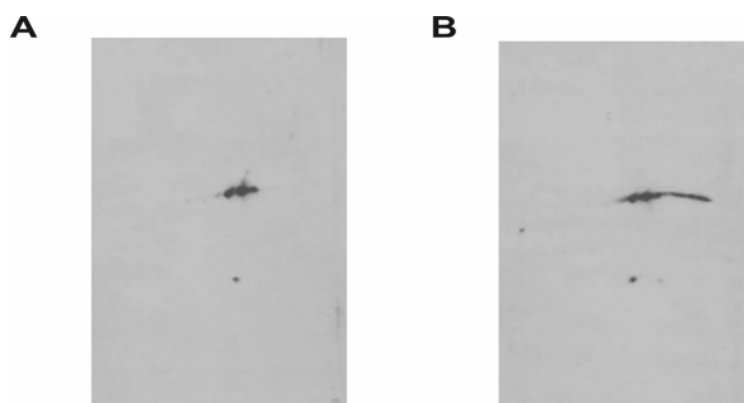
<sup>1</sup>, <sup>2</sup> y <sup>3</sup> corresponden a diferentes isoformas de la misma proteína.



**Figura 38. Análisis proteómico de inducción continuada de las estirpes JNR7/87[pLS1RGFP], JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] y JNR7/87[pRRHK].** (A) Extractos proteicos de inducción continuada de las estirpes JNR7/87[pLS1RGFP], JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] y JNR7/87[pRRHK] analizadas por electroforesis en gel de 2D, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las flechas indican los polipéptidos que están presentes y cuyas cantidades están incrementadas en la estirpe JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] comparadas con el control (JNR7/87[pLS1RGFP]) y con la estirpe JNR7/87[pRRHK]. La mancha correspondiente a la proteína GFP también está indicada. (B) Nivel de expresión de RNAm relativo de los genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos en las estirpes JNR7/87[pRRHK] comparada con la estirpe control JNR7/87[pLS1RGFP] y de la estirpe JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] comparada con la estirpe control JNR7/87[pLS1RGFP] durante la inducción transitoria durante 10 min (barras gris claro) o durante 30min (barras gris oscuro). La longitud de las barras de error representa la desviación estándar de todas las medidas.



Las 12 proteínas identificadas y sus niveles inferidos por la cuantificación de las manchas de proteínas, están resumidos en las tablas 10 y S5. Diez de estas manchas proteicas aumentan sus niveles de expresión en las células carentes de YycG y portadoras del plásmido pRR en todas las condiciones de inducción (Tablas 10 y S5), no estando alteradas en la estirpe hiperexpresora de los genes *YycFG*. Siete de estas manchas protéicas corresponden a proteínas implicadas en la BAG (AccABC, FabKDGF; Sp0419-Sp0425, Sp0427) (Fig. 38A), existiendo cuatro manchas protéicas que se han identificado como isoformas de la proteína FabF (Sp0422), tres de ellas con diferente peso molecular y punto isoeléctrico de los de la proteína nativa (Fig.38A). También se han vuelto a identificar dos isoformas distintas de la proteína YycF tanto en la estirpe JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] como en la estirpe JNR7/87[pRRHK], existiendo en ambas estirpes los mismos niveles de ambas isoformas.

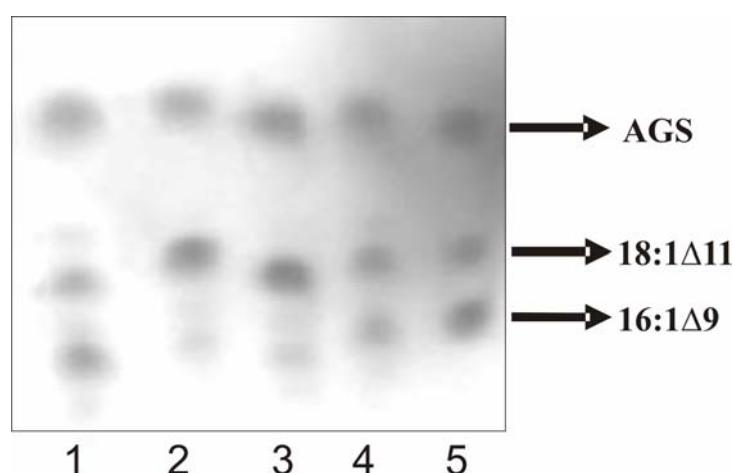


**Figura 39. Detección de la proteína YycF en las estirpes JNR7/87[pRRHK] y JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR].** Los geles bidimensionales obtenidos con extractos proteicos de JNR7/87[pRRHK] (A) y JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] (B) fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa y posteriormente incubados con anticuerpos frente a la proteína YycF. Todas las manchas que se observan en las membranas corresponden a distintas isoformas de la proteína YycF.

Para comprobar si existían o no más isoformas de la proteína YycF, se realizó una detección con anticuerpos frente a la proteína YycF en membrana de nitrocelulosa procedente de los geles bidimensionales de las estirpes JNR7/87[pRRHK] y JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] a los 30 min de inducción continuada, detectando varias isoformas de la proteína YycF de igual o menor peso molecular (Fig. 39), siendo posiblemente la de menor masa molecular un fragmento proteolítico de la proteína. En las preparaciones de la estirpe JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] se detectaron dos isoformas diferentes de YycF que no fueron detectadas en el cultivo JNR7/87[pRRHK].

## 2. 10. Análisis de la composición de ácidos grasos de membrana por cromatografía en capa fina

Tanto los resultados transcriptómicos como los proteómicos indicaban que al igual que en la estirpe JNR7/87[pRR], en la estirpe JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] se encontraban alterados los genes implicados en la BAG de membrana. Además, mostraban que esta la alteración no tenía lugar en la estirpe JNR7/87[pRRHK]. Por ello, procedimos a realizar un análisis comparativo de la composición de ácidos grasos de las membranas de las estirpes JNR7/87, JNR7/87[pRR], JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] y JNR7/87[pRRHK] por cromatografía en capa fina. Cultivos de las estirpes fueron crecidas en AGCH suplementado con 0,8 % de sacarosa hasta una densidad óptica de 0,4 y posteriormente centrifugadas y transferidas a un medio NOCH sin acetato, en presencia de 0,8 % de maltosa y 0,2 % de sacarosa. A este medio se le añadió 126 mCi/ml de  $^{14}\text{C}$  –acetato, manteniéndolo durante 2 horas a 37°C. Se obtuvieron los ácidos grasos correspondientes a estos cultivos por el método de Bligh and Dyer (ver Materiales y Métodos) y se analizaron en una placa de silica gel impregnada en 20 % de nitrato de plata. La comparación del nivel de ácidos grasos saturados y de las dos especies mayoritarias de ácidos grasos insaturados (16:1 $\Delta$ 9 y 18:1 $\Delta$ 11) se muestra en la Fig. 40.



**Figura 40. Análisis por cromatografía en capa fina de los ácidos grasos sintetizados por las diferentes estirpes de *S. pneumoniae*.** Las estirpes de *S. pneumoniae* JNR7/87 (1), JNR7/87[pRR] (2), JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] (3) y JNR7/87[pRRHK] (4) fueron inducidas durante 2 horas en presencia de 0,8% de maltosa y 0,2% de sacarosa en medio NOCH en presencia de 126 mCi de  $^{14}\text{C}$ -acetato. Los lípidos fueron extraídos y transesterificados. Los metil-ésteres fueron separados en fracciones de ácidos grasos saturados (AGS) y ácidos grasos insaturados (AGI) y estos últimos en dos especies 18:1 $\Delta$ 11 y 16:1 $\Delta$ 9, por cromatografía en una placa de silica gel impregnada en un 20% de nitrato de plata. Las placas fueron desarrolladas a -17°C y autoradiografiadas después de 4 días. La muestra 5 corresponde a la estirpe de *E. coli* AK7 que ha sido utilizada como control.

Como se observó en los resultados obtenidos en la Tabla 8, en la estirpe JNR7/87[pRR] (calle 2), en comparación con la estirpe control (calle 1), se detectó un incremento de la proporción de ácidos grasos insaturados de 18 carbonos con respecto a los de 16 carbonos. Este aumento de la proporción C18:C16 también se detectó en la estirpe JNR7/87(*ycgG::kan*)[pRR] y no se detectó en la estirpe JNR7/87[pRRHK].

### **CAPÍTULO 3: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA YycF *in vitro***

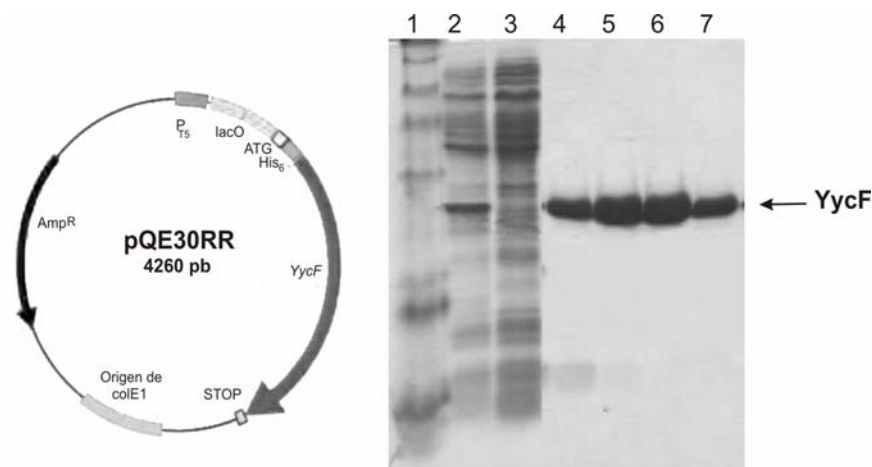
Los resultados obtenidos en el capítulo 2 indicaban que la forma no fosforilada de YycF controla la biosíntesis de los ácidos grasos. Por ello, procedimos a sobreproducir, purificar y caracterizar YycF con el objetivo de realizar posteriormente estudios *in vitro* que validaran una función directa de YycF en la transcripción de los genes implicados en la BAG.

#### **3. 1. Clonación e hiperexpresión del regulador de respuesta YycF en *E. coli***

Para posteriormente purificar el regulador YycF de neumococo clonamos en el vector de expresión pQE30 (Quiagen) un fragmento obtenido por PCR, a partir de DNA cromosómico de *S. pneumoniae*, que contenía el marco abierto de lectura de *yycF*. La construcción resultante, pQE30RR, generó una fusión traduccional de YycF con una etiqueta de seis residuos de histidina (His<sub>6</sub>) en el extremo amino de la proteína (Fig. 40, ver detalles de la construcción en Materiales y Métodos). Posteriormente, procedimos a estandarizar las condiciones de sobreproducción de la proteína, que denominamos proteína His<sub>6</sub>-YycF o YycF recombinante, en la estirpe M15 [pREP4] de *E. coli* en forma soluble, como se describe en Materiales y Métodos. Las condiciones óptimas para obtener la proteína en forma soluble fueron inducción de *E. coli* M15 [pQE30RR, pREP4] crecida a 30°C con 1mM IPTG durante 2 horas (ver Fig. 41).

Para la purificación de YycF recombinante se procedió a preparar extractos totales protéicos a partir de 0,5 litros de cultivo de *E. coli* M15 [pQE30RR, pREP4] inducido mediante disrupción mecánica con una prensa de French. Posteriormente los extractos fueron fraccionados mediante una cromatografía de afinidad empleando una resina de níquel (ver Materiales y Métodos). Para recuperar la proteína unida a la resina, se aplicó un gradiente de 50 a 500 mM de imidazol. Las fracciones de 1ml fueron analizadas por electroforesis en geles desnaturizantes PAA-SDS. La proteína eluyó con una concentración 245 a 318 mM de imidazol. La concentración de YycF recombinante obtenida en varias preparaciones oscilaba en el rango de 0,8 a 1 mg/ml (28,6 a 35,8  $\mu$ M) con un rendimiento de 4 mg por litro de cultivo. La masa molecular de

la proteína es aproximadamente de 28 kDa, siendo compatible con el tamaño previsto (27,9 kDa) del producto del gen *yycF* fusionado a las 6 histidinas (Fig. 41). Estas preparaciones de la proteína YycF recombinante se utilizaron tanto para su análisis por ultracentrifugación como para los estudios de su interacción con DNA y síntesis *in vitro* de mRNA.



**Figura 41. Sobreproducción y purificación de YycF.** El gen *yycF* de la estirpe JNR7/87 de *S. pneumoniae* se amplificó por PCR y se clonó en el vector de expresión pQE30 (Quiagen). El clonaje se realizó de manera que el gen *yycF* se introdujo en la misma pauta de lectura que el segmento que codifica la etiqueta *His<sub>6</sub>*. Esta construcción, pQE30RR, se utilizó para sobreproducir YycF con los seis residuos *His* en su extremo N-terminal (*His<sub>6</sub>-YycF*), en la estirpe M15 de *E. coli*. En la parte derecha se muestra el análisis mediante gel desnaturalizante PAA-SDS del 15 % de las fracciones del pico de elución de la purificación (calles 4 a 7), que se realizó por cromatografía de afinidad con una resina de níquel. Las calles 2 y 3 corresponden al contenido total de proteínas del cultivo de *E. coli* con pQE30RR inducido y una fracción de lavado de la columna de afinidad con una resina de níquel. La calle 1 corresponde a un patrón de peso molecular. La masa molecular aparente de *His<sub>6</sub>-YycF* es de aproximadamente 28 kDa.

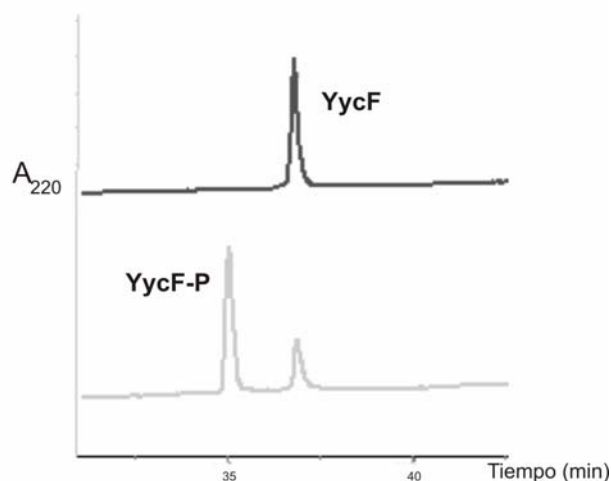
También hemos realizado purificación de proteína insoluble con este mismo sistema de expresión a través de los cuerpos de inclusión. Cuando el sistema se induce con 1 mM de IPTG, a 37°C durante 3 horas la mayor proporción de proteína se encuentra de forma insoluble, formando cuerpos de inclusión (ver detalles en Materiales y Métodos). Estos cuerpos de inclusión se desnaturalizaron y fueron posteriormente solubilizados por tratamiento con 6 M de hidrócloruro de guanidinio (GuHCl) y 50 mM de acetato de amonio ( $\text{Ac-NH}_4$ ) pH 8,0. Posteriormente, la proteína solubilizada fue purificada por cromatografía de afinidad empleando una resina de níquel (ver Materiales y Métodos). La elución de la proteína se produjo durante el lavado de la columna. Las fracciones que contenían la proteína YycF recombinante fueron identificadas por geles PAA-SDS del 15%. Posteriormente, se procedió a la eliminación

del imidazol y al replegado de la proteína tal y como se indica en Materiales y Métodos, y a la concentración de la proteína replegada por precipitación con 70% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , obteniéndose una concentración de proteína de 1 a 1,5 mg/ml (correspondiente a 35,8 a 53,72  $\mu\text{M}$ ) con un rendimiento de 40 mg por litro de cultivo.

Para intentar obtener mayor concentración de proteína recombinante YycF de forma soluble se utilizó otro sistema de hiperexpresión y purificación, el sistema C-LYTAG (Biomedal), que está integrado dentro de la tecnología CASCADE<sup>TM</sup>, tal y como se indica en Materiales y Métodos, obteniendo un menor rendimiento que con el sistema anterior, por lo que este sistema no fue utilizado.

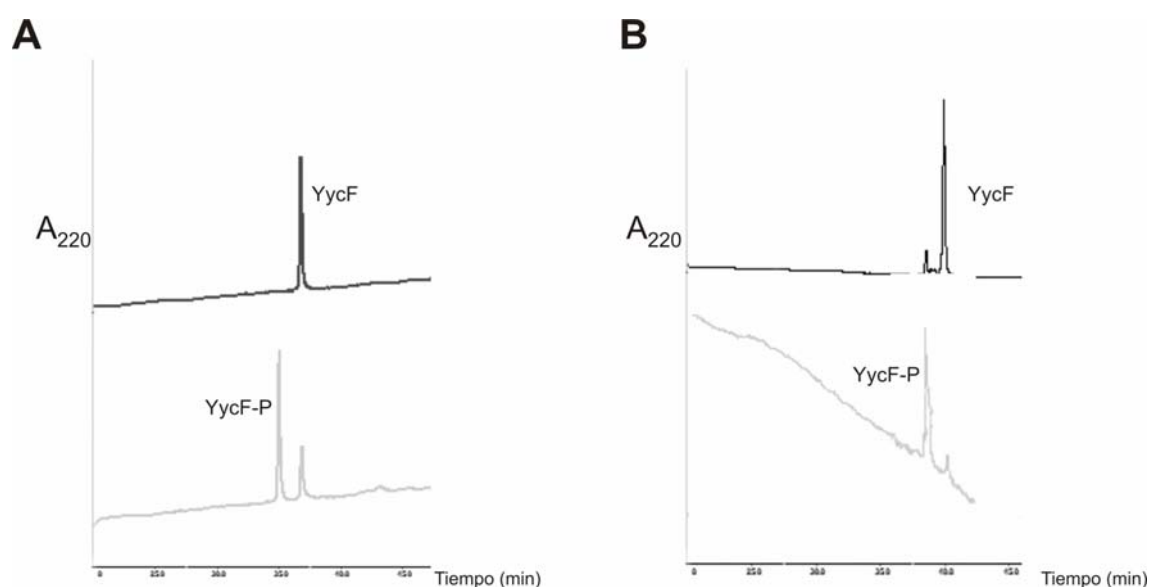
### **3. 2. Ensayos de fosforilación de YycF**

Para intentar detectar si la alteración en la biosíntesis de ácidos grasos era causada por la proteína YycF fosforilada o sin fosforilar, se procedió a realizar una fosforilación química de la proteína YycF recombinante con acetil fosfato, tal y como se indica en Materiales y Métodos. La concentración de proteína que podía fosforilarse vino determinada por la concentración de NaCl (la proteína se encontraba en un tampón que contenía 500 mM de NaCl), ya que concentraciones superiores a 75 mM de NaCl reducían significativamente la proporción de proteína fosforilada que se obtenía. La proteína YycF recombinante no fosforilada, usada como control, fue incubada en el mismo tampón de fosforilación, a excepción del acetil fosfato, que fue eliminado. El porcentaje de proteína fosforilada fue determinado por cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography (HPLC)) en fase reversa con una columna Júpiter C<sub>4</sub> (Phenomenex) de 300A (4,6mm x 250mm) a 25 °C, acoplada a un sistema AKTA (Amersham Pharmacia Biotech). Los polipéptidos fueron detectados por monitorización a una absorbancia de 220 nm. Al analizar la forma no fosforilada de la proteína YycF se detectó un solo pico, indicando que era sintetizada en *E. coli* en forma no fosforilada. Al realizar la fosforilación con 20 mM  $\text{MgCl}_2$  y 10 mM de acetil fosfato, entre el 70 y el 90 % de YycF fue convertida en un pico que eluía más temprano, y que corresponde a la proteína YycF fosforilada (Fig. 42).



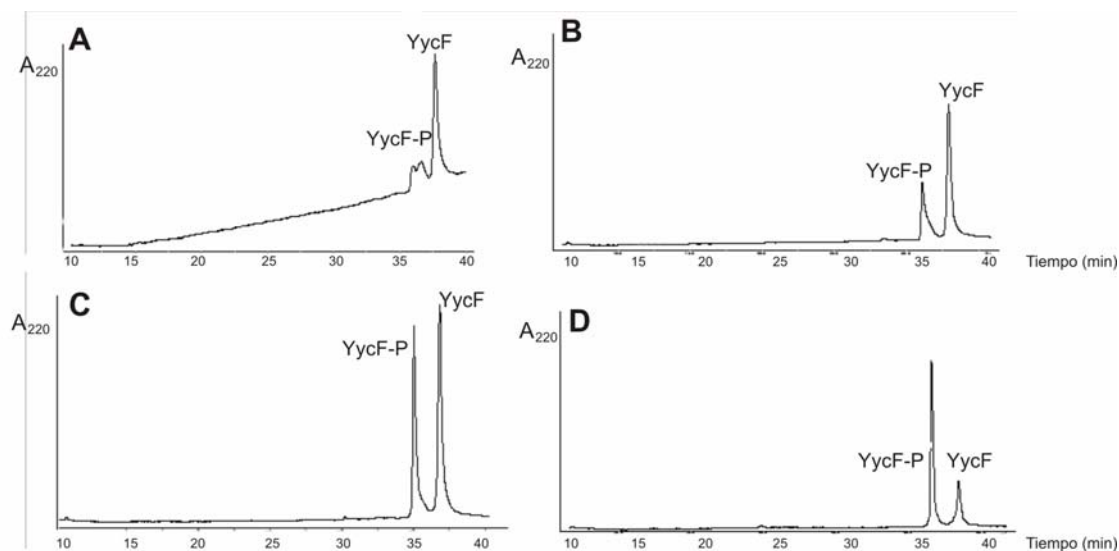
**Figura 42. Fosforilación *in vitro* de la proteína YycF utilizando acetil fosfato como donador.** La proteína YycF fue fosforilada con 10 mM de acetil fosfato en presencia de 20 mM de  $Mg\ Cl_2$ , y la reacción fue analizada por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa en una columna  $C_4$ , tal y como se describe en Materiales y Métodos. En gris oscuro se encuentra la proteína no fosforilada y en gris claro la proteína fosforilada, que eluye antes.

Al analizar por separado la proteína YycF procedente de la fracción soluble o de la fracción insoluble, observamos que inicialmente entre el 10 y el 20 % de la proteína procedente de la fracción insoluble ya se encontraba fosforilada (Fig. 43B). Al realizar la fosforilación química con acetil fosfato, se detectaron niveles similares de fosforilación con ambas preparaciones de proteínas (Fig. 43).



**Figura 43. Fosforilación *in vitro* de la proteína YycF procedente de la fracción soluble o insoluble.** Se analizó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa en una columna  $C_4$ , tal y como se describe en Materiales y Métodos la proteína YycF procedente de la fracción soluble (A) o insoluble (B) antes de fosforilar (línea negra) o después de fosforilar químicamente (línea gris claro).

Al realizar los ensayos de fosforilación a distintas concentraciones de acetil fosfato se observan diferentes proporciones de proteína fosforilada y sin fosforilar (Fig. 44).



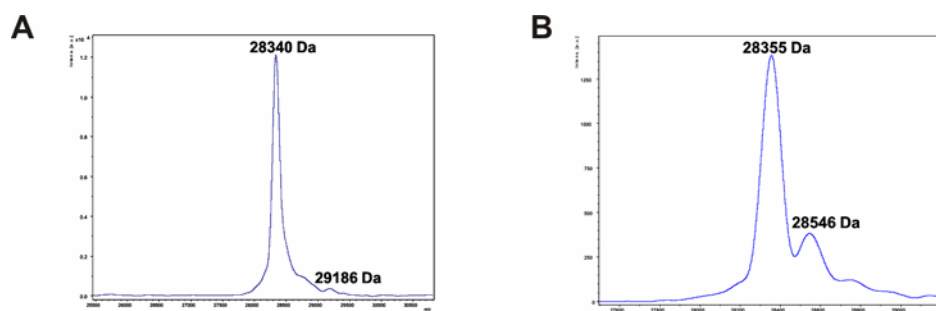
**Figura 44. Análisis de diferentes proporciones de fosforilación de la proteína YycF.** Al realizar la fosforilación a diferentes molaridades de acetil fosfato y analizarlas detectamos diferente porcentaje de muestra fosforilada y sin fosforilar (A) 28,8 % de fosforilación, (B) 35 % de fosforilación, (C) 44,5 % de fosforilación y (D) 72,6 % de fosforilación. En la gráfica A se pueden observar, en la proteína fosforilada, dos picos diferentes.

En una muestra con una baja proporción de proteína fosforilada se separaron dos picos correspondientes a proteínas fosforiladas por HPLC (Fig. 45B).

El análisis de los dos picos mediante MALDI-TOF, permitió establecer que las masa moleculares de las proteínas eran de 28,355 y 28,546 kDa, valores esperados para His<sub>6</sub>-YycF conteniendo 1 o 2 fosfatos. Así mismo, el análisis de MALDI-TOF reveló que el pico detectado por HPLC en las preparaciones de proteínas no fosforiladas (Fig. 45A) poseía una masa molecular de 28,340 kDa, valor esperado para His<sub>6</sub>-YycF y que en las reacciones con una eficiencia elevada de fosforilación la masa molecular del pico mayoritario era de 28,355 kDa.

Los resultados obtenidos indicaron que la proteína fosforilada químicamente contiene dos fosfatos.

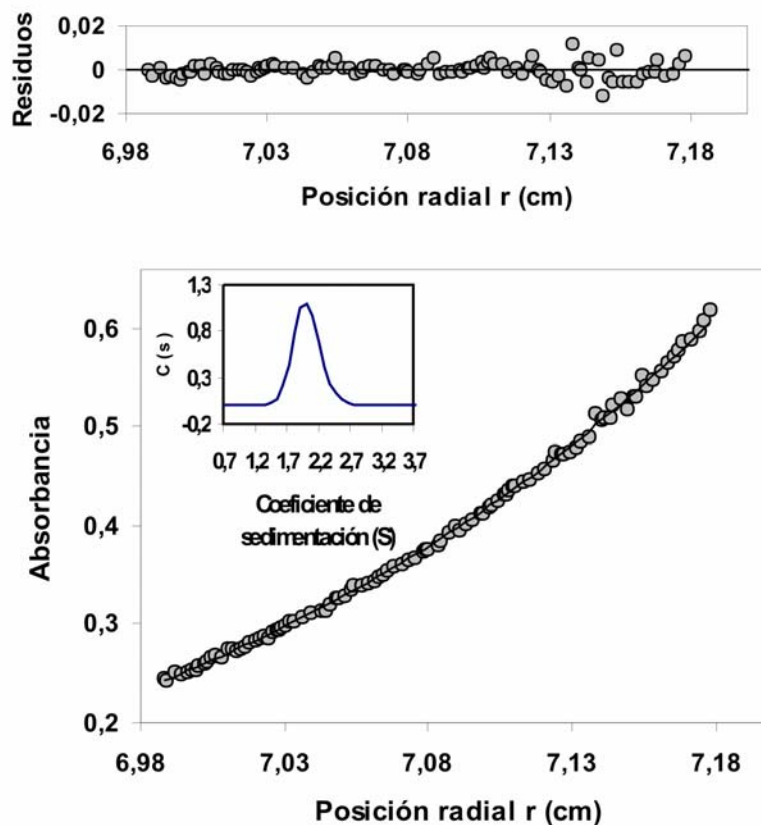




**Figura 45. Análisis por MALDI-TOF de la proteína fosforilada y sin fosforilar.** Se analizaron por separados los dos picos obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. (A) Pico correspondiente a la proteína YycF sin fosforilar (B) Pico correspondiente a la proteína YycF fosforilada. En la gráfica se encuentran indicadas las masas moleculares correspondientes de las diferentes especies obtenidas. Por cada incorporación de un grupo fosfato se aumenta en 80 Da el peso molecular de la proteína.

### 3. 3. Análisis por ultracentrifugación de la proteína YycF

El equilibrio de sedimentación fue realizado para determinar el estado de asociación de la proteína His<sub>6</sub>-YycF producida en forma soluble. El estado de oligomerización de la proteína His<sub>6</sub>-YycF fue analizado a través de ultracentrifugación analítica, usando tres concentraciones diferentes de proteína (5, 10 y 20 mM). El análisis de equilibrio de sedimentación nos dio resultados similares con las tres concentraciones probadas, obteniendo una masa molecular de 27,700 kDa, que esencialmente corresponde a una proteína monomérica (27,920 kDa). En la Fig. 46 se muestra el gradiente experimental obtenido para 20 mM de proteína y el mejor ajuste correspondiente que encaja con el gradiente (línea sólida). Además, el análisis de velocidad de sedimentación nos indicó que YycF es una proteína monomérica en solución en las condiciones probadas, y el coeficiente de sedimentación (S) obtenido de  $2,021 \pm 0,276$  era compatible con la forma monomérica de la proteína. Por tanto, en presencia de 500 mM NaCl y 50 mM Tris-HCl, His<sub>6</sub>-YycF producida en forma soluble y posteriormente purificada es una proteína monomérica en solución, al menos hasta una concentración de 0,56 mg/ml.



**Figura 46. Perfil de ultracentrifugación analítica de YycF procedente de la fracción de proteína soluble.** En la figura se muestra el perfil por equilibrio de sedimentación de 20 mM de YycF, a 15.000 rpm, a 20 °C y con una longitud de onda de 277 nm. Los círculos grises representan los datos experimentales; la línea continua es el mejor ajuste para una especie monomérica en equilibrio de sedimentación. El peso molecular fue de 27,700 kDa a esta concentración de proteína. Inserto: Distribución de la velocidad de sedimentación (50.000 rpm a 20 °C) de la misma YycF que se muestra en la figura principal.

También se analizó por ultracentrifugación la proteína His<sub>6</sub>-YycF producida en forma insoluble y purificada en forma soluble. Al analizar esta preparación por ultracentrifugación se detectó que esta proteína era monomérica, con un coeficiente de sedimentación próximo a 2. La distribución de la velocidad de sedimentación fue un poco más amplia de lo esperado (datos no mostrados). Estos resultados podían indicar que existían diferentes conformaciones de YycF con similar masa molecular que podían ser encontradas simultáneamente en la muestra. Esta hipótesis estaba apoyada por la detección de formas fosforiladas y no fosforiladas de YycF (Fig. 43), detectadas en estas preparaciones.

También, se realizaron análisis de ultracentrifugación de las preparaciones de las proteínas fosforiladas químicamente. El análisis mostró que YycF recombinante

después de la fosforilación era insoluble, independiente de que se hubiera producido en forma soluble o insoluble (datos no mostrados).

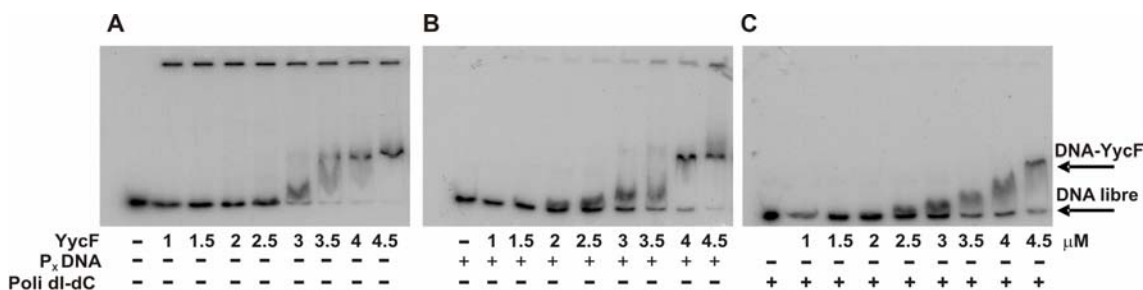
Como consecuencia de los resultados obtenidos en la caracterización de las proteínas YycF recombinantes fosforiladas y no fosforiladas, decidimos que para los estudios posteriores se utilizaría tan sólo la proteína producida en forma soluble y no fosforilada, ya que era la única que parecía mostrar ser soluble, homogénea y poseer un plegamiento correcto.

### **3. 4. Detección y análisis, mediante ensayos de retardo en gel, de los complejos formados por la unión de la proteína YycF a un DNA específico**

Los resultados obtenidos indicaban que la proteína YycF parece estar implicada en la regulación de la biosíntesis de ácidos grasos, y más concretamente en la regulación de la expresión del represor transcripcional FabT, ya que la inactivación del mismo conlleva a una alteración en la biosíntesis de ácidos grasos similar a la observada en este trabajo (Lu y Rock, 2006). Para corroborar esta hipótesis, se realizaron ensayos de actividad de unión de la proteína YycF al DNA que contiene la región promotora del represor transcripcional FabT.

Para la realización de este ensayo se utilizó la preparación de proteína His<sub>6</sub>-YycF pura obtenida de la fracción soluble. Para observar la formación de complejos YycF-DNA de *fabT* se realizaron ensayos de retardo en gel con el fragmento FabTbind de DNA que contiene la región promotora de FabT (ver detalles de preparación del fragmento marcado radioactivamente por PCR en Materiales y Métodos) y que incluye los palíndromos a los que se une este represor transcripcional, regulando su propia expresión (Lu y Rock, 2006). Estos ensayos se realizaron con diferentes relaciones proteína: DNA, sin DNA competidor y en presencia de competidores poli dI-dC o DNA heterólogo utilizados para evitar uniones inespecíficas. *S. pneumoniae* es una bacteria gram positiva con alto contenido en adeninas y timinas. Por ello, como DNA heterólogo competidor se utilizó un fragmento de PCR conteniendo el promotor del operón *malXCD* de *S. pneumoniae* que posee un tamaño similar al de FabTbind y un contenido similar de adeninas y timinas.

Las reacciones de unión se realizaron tal como se describe en Materiales y Métodos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los complejos His<sub>6</sub>-YycF-DNA *de fabT* fueron analizados en geles nativos de PAA al 5 % (Fig. 47).



**Figura 47. Interacción de la región promotora de FabT con la proteína YycF.** En la figura se muestran los ensayos de retardo en gel con el fragmento de la región promotora de FabT. Las reacciones contienen una concentración de 1 nM del fragmento FabTbind marcado radiactivamente con [ $\alpha^{32}$ P]dCTP y se llevaron a cabo a distintas concentraciones de proteína en ausencia de DNA competidor (A), o en presencia de competidores inespecíficos: poli dI-dC (B) o un fragmento inespecífico que contiene el promotor Px del regulón de la maltosa de *S. pneumoniae* (C). En la imagen se indica el complejo obtenido en todos los casos.

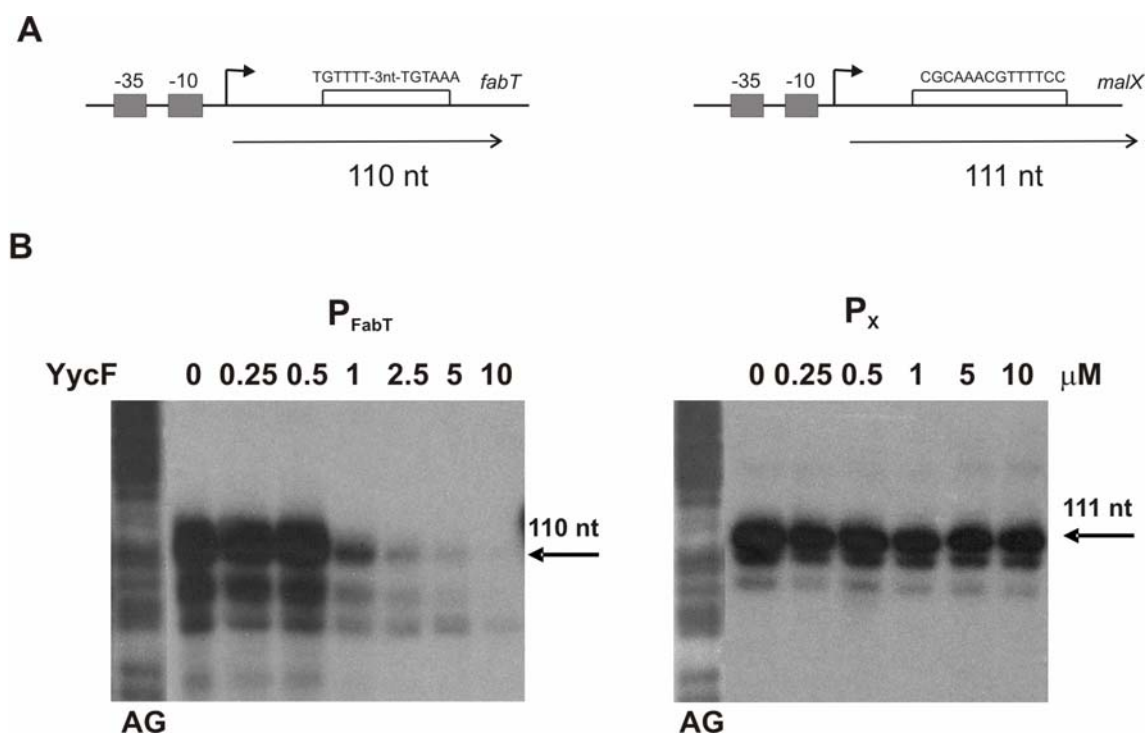
En la unión de YycF al fragmento FabTbind se observó un solo complejo específico detectable a una concentración protéica próxima a 3 μM. Sin embargo, este complejo mostró una migración difusa en los geles de PAA, posiblemente como consecuencia de la baja estabilidad de la unión de la proteína al DNA (Fig. 47) o como consecuencia de la elevada concentración salina a la que se lleva a cabo la reacción y que es necesaria para que la proteína se encuentre en forma soluble (500 mM NaCl). Todos los intentos realizados para mejorar la naturaleza de los complejos (modificación de la composición de: (i) los geles, (ii) tampones de carrera y (iii) condiciones de electroforesis) fue infructuosa. Por ese motivo no fue posible utilizar esta técnica para determinar las constantes de afinidad de la proteína por el DNA.

Sin embargo y a pesar de la naturaleza del complejo observado, la detección de su formación en presencia de poli dI-dC y de DNA competidor indicó que el complejo era específico.

### 3. 5. Alteración de la síntesis *in vitro* de mRNA por YycF

Los resultados obtenidos en los estudios de interacción de YycF con el promotor de FabT indicaban una acción directa del regulador de respuesta sobre la transcripción de FabT. Para comprobar si esta hipótesis era correcta, procedimos a realizar ensayos de transcripción *in vitro*.

En los ensayos se utilizó como sustrato la región promotora del gen *fabT* ( $P_{FabT}$ ) y se empleó como control la región promotora de operón *malXCD* ( $P_X$ ) de *S. pneumoniae*, en presencia o ausencia de la proteína YycF (Fig. 48A).



**Figura 48. Transcripción *in vitro* de los promotores  $P_{fabT}$  y  $P_X$ .** (A) Los DNA molde lineales de 194 pb (*fabT*) o 319 pb (*malX*) fueron usados para realizar ensayos de transcripción *in vitro*. Estos DNAs molde contienen las regiones -35 y -10 de los promotores. Los rectángulos vacíos representan los operadores a los que se unen las proteínas FabT y MalR. (B) Efecto de la proteína YycF en la transcripción. Los fragmentos transcritos desde  $P_{FabT}$  (izquierda) y  $P_X$  (derecha) sintetizados por la RNA polimerasa de *E. coli* en presencia o ausencia de la proteína YycF se muestran en este panel. La longitud esperada (A) y obtenida (B) de los fragmentos transcritos desde  $P_{FabT}$  y  $P_X$  se muestra indicada.

Para realizar este ensayo, se utilizó la holoenzima  $\sigma^{70}$  de la RNA polimerasa de *E. coli*, usando como molde los amplicones que se muestran en la figura 47A, que contienen  $P_{FabT}$  o  $P_X$ , en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de la

proteína YycF. Fueron detectados los fragmentos transcritos esperados, de 110 nt y 111 nt, respectivamente. La RNA polimerasa de *E. coli* fue capaz de conducir eficientemente la transcripción desde ambos promotores tanto en presencia como en ausencia de YycF (Fig. 48B). Conforme aumentaba la concentración de proteína YycF en la mezcla de reacción, el nivel de los fragmentos transcritos desde el promotor de *fabT* fue descendiendo, cosa que no ocurrió en el caso del fragmento transcrito desde el promotor P<sub>x</sub>, cuyos niveles de transcripción no se vieron afectados por la presencia o ausencia de la proteína YycF.

Estos resultados mostraron una interacción específica de YycF con la región promotora de *fabT*, que tenía como consecuencia reprimir la transcripción del regulador FabT.

## **TABLAS SUPLEMENTARIAS**





## TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla S1. Genes afectados por el sistema de inducción y detectados por análisis genómico, durante la inducción transitoria o continuada

Categoría funcional	TIGR n°	Producto génico (gen)	Proporción <sup>1</sup>	p-Valor <sup>1</sup>	Proporción <sup>2</sup>	p-Valor <sup>2</sup>
Metabolismo de azúcares	SP0266	Glucosamina-fructosa-6-P aminotransferasa	0,4	9,90E-3	0,9	8,60E-1
	SP0268	Amilopululunasa alcalina ( <i>pulA</i> )	5,0	3,92E-3	3,0	1,70E-4
	SP0342	Glucano $\alpha$ -1,6 glucosidasa ( <i>DexB</i> )	7,6	1,52E-3	3,5	3,20E-3
	SP1382	$\alpha$ -amilasa	3,4	3,50E-4	4,1	5,79E-4
	SP0060	Beta-galactosidasa ( <i>bgaC</i> )	2,7	3,56E-3	1,5	1,63E-1
	SP0314	Hialuronidasa ( <i>hysA</i> )	2,5	2,03E-3	2,1	5,16E-7
	SP0668	Glucoquinasa ( <i>glcA</i> )	3,4	7,28E-3	2	1,01E-1
	SP0715	Lactato oxidasa ( <i>lctO</i> )	2,7	3,77E-8	1,6	1,95E-4
	SP0896	6-Fosfofructoquinasa	0,8	2,92E-4	2,2	6,82E-2
	SP1243	Glucosa 6-P-deshidrogenasa ( <i>zwf</i> )	0,3	1,80E-3	0,8	9,92E-1
	SP1685	N-acetilmanosamina 6-P epimerasa ( <i>nanE</i> )	4,5	9,92E-4	0,8	5,10E-1
	SP1721	Fructoquinasa ( <i>scrK</i> )	0,3	1,62E-7	1,3	1,54E-3
	SP1724	Sacarosa 6 fosfato hidrolasa ( <i>scrB</i> )	0,3	5,40E-4	0,9	3,72E-1
	SP1725	Represor del operón sacarosa ( <i>scrR</i> )	0,4	7,77E-4	1,1	2,33E-1
	SP1799	Represor del operón de sacarosa ( <i>susR</i> )	0,3	2,09E-4	0,6	1,94E-2
	SP1883	Dextrano glucosidasa ( <i>DexS</i> )	5,3	3,86E-2	5,6	9,04E-4
	SP1898	$\alpha$ -galactosidasa ( <i>aga</i> )	2,9	3,81E-3	1,5	3,96E-3
	SP1119	Gliceraldehido 3-P deshidrogenasa	0,8	4,89E-1	2	9,20E-9
	SP2106	Metabolismo de la maltosa ( <i>malP</i> )	2,7	3,36E-3	3,5	1,26E-3
	SP2107	Metabolismo de la maltosa ( <i>malM</i> )	3,3	9,95E-4	2,1	8,26E-3
	SP2108	Metabolismo de la maltosa ( <i>malX</i> )	23,1	1,01E-7	2	5,68E-4

Transporte	SP2109	Metabolismo de la maltosa ( <i>malC</i> )	19,6	2,28E-5	6,2	4,76E-7
	SP2110	Metabolismo de la maltosa ( <i>malD</i> )	17,4	1,49E-5	8,1	2,19E-5
	SP2111	Metabolismo de la maltosa ( <i>malA</i> )	3,4	3,31E-5	2,4	2,61E-5
	SP0061	Componente EIIB de un sistema PTS	2	4,96E-3	2	2,85E-3
	SP0062	Componente EIIC de un sistema PTS	2	2,56E-3	2,6	7,63E-5
	SP0638	Sistema transportador ABC	2,4	9,04E-5	2,3	8,28E-5
	SP0758	Sistema PTS	6,4	1,21E-10	2,25	5,09E-5
	SP0282	Sistema PTS específico de manosa ( <i>manN</i> )	2,4	4,16E-2	2	6,53E-2
	SP0283	Sistema PTS específico de manosa ( <i>manM</i> )	2,6	1,21E-4	2	3,36E-5
	SP0284	Sistema PTS específico de manosa ( <i>manL</i> )	2,5	1,19E-3	1,7	4,26E-4
	SP1241	Sistema transportador ABC ( <i>glnD</i> )	0,1	9,26E-8	0,5	4,78E-2
	SP1242	Sistema transportador ABC ( <i>glnQ</i> )	0,3	8,35E-5	0,5	1,74E-1
	SP1580	Sistema transportador ABC ( <i>msmK</i> )	2,7	2,05E-4	1,2	3,25E-1
	SP1648	Sistema transportador de manganeso ( <i>psaB</i> )	0,1	2,38E-5	0,5	3,07E-3
	SP1650	Sistema transportador de manganeso ( <i>psaA</i> )	0,2	3,73E-4	0,5	1,36E-1
	SP1682	Sistema transportador ABC de azúcares	4,1	6,43E-3	1,5	1,70E-1
	SP1683	Sistema transportador ABC de azúcares	4,6	1,36E-3	1,1	1,61E-1
	SP1684	Sistema PTS específico de azúcares	4,2	2,78E-4	0,9	8,71E-1
	SP1722	Sistema PTS específico de azúcares ( <i>scrA</i> )	0,3	8,61E-3	0,9	3,53E-1
	SP1884	Sistema PTS transportador de trehalosa ( <i>treP</i> )	11,4	2,77E-2	5,8	7,36E-4
Biosíntesis de purinas y pirimidinas	SP0044	Fosforibosil-aminoimidazol succinocarboxiamida sintetasa ( <i>purC</i> )	0,05	2,25E-2	0,8	2,77E-1

	SP0045	Fosforibosil glicinamida ( <i>purL</i> )	formil sintetasa	0,09	1,03E-3	1,1	3,32E-1
	SP0046	Amido transferasa ( <i>purF</i> )	fosforibosil	0,04	1,01E-5	1,3	2,36E-2
	SP0047	Fosforibosil ciclo-ligasa ( <i>purM</i> )	glicinamida	0,4	1,77E-3	1	5,50E-1
	SP0048	Fosforibosil formiltransferasa ( <i>purN</i> )	glicinamida	0,2	3,53E-5	1	1,40E-1
	SP0050	Fosforibosil formiltransferasa ( <i>purH</i> )	imidazol carboxiamida	0,06	6,33E-4	1,2	2,49E-1
	SP0051	Fosforibosil glicina ligasa ( <i>purD</i> )	amina	0,13	4,51E-4	1	3,07E-1
	SP0053	Fosforibosil aminoimidazol carboxilasa- catalítica ( <i>purE</i> )	subunidad	0,1	3,42E-4	1	2,86E-2
	SP0054	Fosforibosil aminoimidazol carboxilasa- ATPasa ( <i>purK</i> )	subunidad	0,2	1,41E-5	1,2	5,4E-3
	SP0055	Proteína hipotética		0,2	1,46E-3	1	2,36E-1
	SP0056	Adenilsuccinato ( <i>purB</i> )	liasa	0,3	2,31E-6	1	2,93E-1
	SP1275	Carbamoil-P ( <i>carB</i> )	sintetasa	0,2	7,37E-10	0,5	1,05E-3
	SP1276	Carbamoil-P ( <i>carA</i> )	sintetasa	0,3	9,56E-6	0,6	1,79E-1
<b>Otros Metabolismos</b>	SP2239	Serin- proteasa		0,2	6,30E-4	0,4	2,56E-3
	SP0783	Biotina sintetasa ( <i>bioY</i> )		0,2	7,85E-3	0,4	5,59E-2

Se consideran cambios significativos alteraciones de expresión > 2 veces o < 0,5 veces entre el cultivo inducido y sin inducir. Además, se consideran significativos los cambios con un  $\rho$ -Valor <0,05 con un 95% de confianza.

<sup>1</sup>Cambios de expresión entre cultivos de JNR7/87[pLS1RGFP] inducidos transitoriamente y sin inducir.

<sup>2</sup>Cambios de expresión entre cultivos de JNR7/87[pLS1RGFP] inducidos de forma continuada y sin inducir.

**Tabla S2. Genes afectados por la inducción transitoria durante 5 min del gen *yycF*, detectadas por análisis genómico**

Categoría funcional	TIGR4 n°	Producto génico (gen)	Proporción <sup>1</sup>	p-Valor
Metabolismo de los ácidos grasos	Sp0419	Enoil-ACP-reductasa ( <i>fabK</i> )	1,965	9,67E-08
	Sp0420	Malonil-CoA-transacilasa ( <i>fabD</i> )	2,022	4,15E-06
	Sp0421	3-Oxoacil-ACPI-reductasa ( <i>fabG</i> )	1,893	1,73E-03
	Sp0422	3-Oxoacil-ACP-sintetasa II ( <i>fabF</i> )	1,796	5,93E-05
	Sp0423	Acetil- CoA carboxilasa ( <i>accB</i> )	1,855	1,96E-03
	Sp0424	3-hidroxiacil-ACP-dehidratasa ( <i>fabZ</i> )	2,027	1,04E-06
	Sp0425	Acetil-CoA carboxilasa, biotina carboxilasa ( <i>accC</i> )	2,007	5,51E-07
	Sp0426	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad $\beta$ ( <i>accD</i> )	1,861	7,74E-06
	Sp0427	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad $\alpha$ ( <i>accA</i> )	2,098	1,06E-05
Regulación	Sp1226 <sup>2</sup>	Histidina quinasa ( <i>yycG</i> )	5,466	1,39E-10
	Sp1227 <sup>2</sup>	Regulador de respuesta ( <i>yycF</i> )	3,366	3,24E-05
Transporte	Sp0042	Permeasa transportadora del factor de competencia ( <i>comA</i> )	1,992	1,25E-03
	Sp1682	Permeasa del sistema de transporte ABC	0,556	1,98E-02
	Sp1683	Proteína de unión a azúcares del sistema de transporte ABC	0,469	2,53E-03
	Sp1684	Componente IIBC del sistema PTS	0,440	7,03E-03
	Sp1869 <sup>2</sup>	Permeasa del sistema de transporte ABC de hierro ( <i>piaB</i> )	0,514	8,75E-04
	Sp1870 <sup>2</sup>	Permeasa del sistema de transporte ABC de hierro ( <i>piaC</i> )	0,535	8,92E-03
	Sp1871 <sup>2</sup>	Proteína de unión a ATP del sistema de transporte ABC de hierro ( <i>piaD</i> )	0,538	5,87E-04
	Sp1872 <sup>2</sup>	Proteína de unión a hierro del sistema de transporte ABC de hierro ( <i>piaA</i> )	0,579	5,49E-02
Metabolismo energético	Sp2148	Arginina deiminasa ( <i>arcA</i> )	0,303	2,11E-04
	Sp2150	Ornitina carbamoiltransferasa ( <i>argF</i> )	0,419	7,19E-04
	Sp2166	L- Fuculosa fosfato aldolasa ( <i>fucA</i> )	0,533	5,06E-02
	Sp2167	Posible L- Fuculosa quinasa, fucK	0,328	6,09E-03
Hipotéticas	Sp0125	Proteína hipotética	2,355	3,30E-04
	Sp1685	Proteína hipotética conservada	0,461	1,90E-02

<sup>1</sup> Se han seleccionado genes con cambios de expresión > 1,75 veces o < 0,75 veces entre JNR7/87[pRR] y JNR7/87[pLS1RGFP].

<sup>2</sup> También detectados por Ng y colaboradores después de la disminución de la expresión del gen *yycF*.

**Tabla S3. Genes afectados por la inducción continuada del gen *yycF*, detectados por análisis genómico**

Categoría funcional	TIGR4 n°	Producto génico (gen)	Proporción <sup>1</sup>	p-Valor
Metabolismo de los ácidos grasos	Sp0416	Regulador transcripcional de la familia de MarR ( <i>fabT</i> )	0,402	2,60E-04
	Sp0417	3-Oxoacil-ACP-sintetasa III ( <i>fabH</i> )	0,395	4,48E-03
	Sp0420	Malonil-CoA-transacilasa ( <i>fabD</i> )	1,897	5,19E-04
	Sp0421	3-Oxoacil-ACPI-reductasa ( <i>fabG</i> )	1,898	8,40E-03
	Sp0423	Acetil- CoA carboxilasa ( <i>accB</i> )	2,022	2,29E-03
	Sp0424	3-hidroxiacil-ACP-dehidratasa ( <i>fabZ</i> )	2,209	2,43E-05
	Sp0425	Acetil-CoA carboxilasa, biotina carboxilasa ( <i>accC</i> )	2,162	9,53E-06
	Sp0426	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad $\beta$ ( <i>accD</i> )	2,027	1,24E-05
	Sp0427	Acetil-CoA carboxilasa, subunidad $\alpha$ ( <i>accA</i> )	1,962	7,90E-04
Regulación	Sp2222	CDP-diacilglicerol-3- fosfato 3- fosfatidiltransferasa ( <i>pgsA</i> )	0,549	8,77E-04
	Sp1226 <sup>2</sup>	Histidina quinasa ( <i>yycG</i> )	7,056	4,31E-15
	Sp1227 <sup>2</sup>	Regulador de respuesta ( <i>yycF</i> )	5,131	7,72E-08
Transporte	Sp1527	Proteína de unión a oligopeptido del sistema de transporte ABC ( <i>aliB</i> )	3,479	1,47E-05
	Sp1587	Antitransportador oxalato:formato	1,832	8,23E-04
	Sp1602	Proteína <i>phnA</i> ( <i>phnA</i> )	0,574	5,30E-03
	Sp1640	Proteína permeasa del sistema de transporte ABC de manganeso ( <i>psaC</i> )	2,042	1,97E-04
	Sp2022 <sup>2</sup>	Componente IIC del sistema PTS	2,132	2,99E-05
	Sp2219	Proteína permeasa del sistema de transporte ABC	0,579	2,42E-02
	Sp2220	Proteína de unión a ATP del sistema de transporte ABC	0,464	3,16E-03
	Sp2221	Proteína de unión a ATP del sistema de transporte ABC	0,437	5,78E-03
Envuelta celular	Sp0107 <sup>2</sup>	Proteína con dominio LysM	3,592	4,52E-07
	Sp0641 <sup>2</sup>	Serin proteasa	2,142	5,08E-03
	Sp0965 <sup>2</sup>	Endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa ( <i>lytB</i> )	8,544	5,43E-09
	Sp2021	Glicosil hidrolasa ( <i>bgl2</i> )	2,175	1,90E-06
	Sp2063	Proteína con dominio LysM	7,941	5,60E-08
	Sp2216 <sup>2</sup>	Hidrolasa de la pared celular ( <i>pcsB</i> )	2,613	1,35E-07
	Sp2218	Proteína determinante de la forma celular MreC ( <i>mreC</i> )	0,364	1,13E-04
Biosíntesis de purinas y pirimidinas	Sp0044	Fosforibosil-amino-imidazol sucinocarbamida sintetasa ( <i>purC</i> )	2,180	1,04E-04

	Sp0049	Fosforiboxil-imidazol carboxiamida formiltransferasa ( <i>purH</i> )	1,812	2,09E-04
	Sp0964	Dihidrorato deshidrogenasa ( <i>pyrDb</i> )	1,892	5,80E-06
	Sp1277	Aspartato carbamoil transferasa ( <i>pyrB</i> )	2,012	4,30E-05
Choque térmico y estrés	Sp0515 <sup>2</sup>	Represor transcripcional de choque térmico HrcA ( <i>hrcA</i> )	2,151	6,87E-04
	Sp0516 <sup>2</sup>	Proteína de choque térmico GrpE ( <i>grpE</i> )	2,245	3,72E-03
	Sp0517 <sup>2</sup>	Proteína DnaK ( <i>dnaK</i> )	3,734	4,02E-03
	Sp1906 <sup>2</sup>	Chaperona de 60 kDa ( <i>groEL</i> )	2,196	3,99E-03
Síntesis y degradación de proteínas	Sp1029	Metiltransferasa de RNA de la familia TrmA	2,428	4,84E-03
	Sp1343	Proteína de la familia prolin oligopeptidasa	2,055	5,01E-05
	Sp2223 <sup>2</sup>	Proteína hipotética conservada	0,555	1,07E-02
	Sp2224 <sup>2</sup>	Peptidasa de la familia M16	0,424	6,39E-04
	Sp2225 <sup>2</sup>	Posible proteasa	0,281	1,07E-04
Metabolismo intermediario central	Sp0918	Espermidina sintetasa ( <i>speE</i> )	2,561	7,02E-04
	Sp0919	Proteína hipotética conservada	2,043	1,13E-04
	Sp0920	Carboxinoespermidina descarboxilasa ( <i>nspC</i> )	3,047	3,17E-06
Energía metabólica	Sp1190	Tagatosa 1,6-difosfato aldolasa ( <i>lacD</i> )	2,543	4,20E-05
	Sp1191	Tagatosa-6-fosfato quinasa ( <i>lacC</i> )	2,186	3,60E-04
	Sp1192	Subunidad LacB de la Galactosa-6-fosfato isomerasa ( <i>lacB</i> )	2,581	5,86E-06
	Sp1853	Galactoquinasa ( <i>galK</i> )	2,215	2,50E-06
Biosíntesis de cofactores	Sp0177	Subunidad $\alpha$ de la riboflavina sintetasa ( <i>ribE</i> )	2,664	1,96E-04
Hipotéticas	Sp0125	Proteína hipotética	1,906	4,35E-06
	Sp0171	Proteína de la familia ROK	1,916	3,14E-03
	Sp0917	Proteína relacionada con la inversión génica del pilin	1,881	5,46E-06
	Sp0922	Proteína de la familia carbono-nitrógeno hidrolasa	2,774	2,12E-04
	Sp1093	Proteína hipotética	2,711	6,19E-03
	Sp1601	Proteína hipotética conservada	0,629	2,59E-02
	Sp1739	Proteína con dominio HK	0,494	3,47E-04
	Sp2061 <sup>2</sup>	Proteína hipotética conservada	2,469	4,13E-04

<sup>1</sup> Se seleccionaron genes con cambios de expresión > 1,75 veces o < 0,75 veces entre JNR7/87[pRR] y JNR7/87[pLS1RGFP].

<sup>2</sup> También detectados por Ng y cols. (2005) después de la disminución de la expresión del gen *yycF*.

**Tabla S4. Genes con patrón de expresión alterado en las estirpes JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] y JNR7/87[pRRHK] con respecto a la estirpe control JNR7/87[pLS1RGFP]**

Categoría funcional	TIGR4 n°	Producto génico (gen)	JNR7/87 <i>yycG::Kan</i> [pRR]		JNR7/87[pRRHK]		
			10 min	30 min	10 min	30 min	Inducción continuada
Envuelta celular	Sp0107 <sup>1,2</sup>	Proteína con dominio LysM	5,10±0,66	2,82±0,87	2,96±1,25	2,32±0,87	4,95±1,27
	Sp0965 <sup>1,2</sup>	Endo-β-N-acetilglucosaminidasa ( <i>lytB</i> )	5,89±1,23	8,00±0,78	1,91±0,08	4,28±0,53	6,41±2,40
	Sp2063 <sup>1</sup>	Proteína con dominio LysM	5,95±2,33	6,6±1,87	3,85±1,48	5,54±1,2	6,99±2,05
	Sp2216 <sup>1,2</sup>	Hidrolasa de pared celular ( <i>pcsB</i> )	1,98±0,34	1,51±0,31	1,67±0,22	1,63±0,39	4,64±1,87
	Sp2217	<i>MreD</i>	0,72±0,02	0,71±0,11	0,75±0,23	0,55±0,09	0,46±0,14
	Sp2218 <sup>1</sup>	<i>MreC</i>	0,60±0,12	0,41±0,13	0,66±0,23	0,38±0,05	0,32±0,13
Transporte	Sp2219 <sup>1</sup>	Permeasa del sistema transportador ABC	0,60±0,10	0,61±0,14	0,63±0,16	0,47±0,03	0,41±0,08
	Sp2220 <sup>1</sup>	Proteína de unión a ATP del sistema transportador ABC	0,66±0,13	0,43±0,15	0,65±0,08	0,40±0,01	0,38±0,10
	Sp2221 <sup>1</sup>	Proteína de unión a ATP del sistema transportador ABC	0,74±0,22	0,40±0,13	0,61±0,10	0,41±0,08	0,39±0,07
Degradación de proteínas	Sp2223 <sup>1,2</sup>	Proteína hipotética conservada	0,92±0,18	0,69±0,15	0,59±0,19	0,34±0,11	0,44±0,07
	Sp2224 <sup>1,2</sup>	Peptidasa de la familia M16	0,62±0,03	0,36±0,13	0,76±0,14	0,27±0,05	0,36±0,11
	Sp2225 <sup>1,2</sup>	Posible proteasa	0,80±0,36	0,34±0,28	0,83±0,27	0,52±0,31	0,35±0,11
Regulación	Sp1226 <sup>1,3</sup>	Histidina quinasa ( <i>yycG</i> )	9,73±5,30	10,24±3,61	47,21±12,7	38,06±8,34	48,93±6,74
	Sp1227 <sup>1</sup>	Regulador de respuesta ( <i>yycF</i> )	22,89±2,93	8,19±1,51	32,50±14,22	17,80±4,71	43,13±8,67
Hipotética	Sp0125 <sup>1</sup>	Proteína hipotética	1,82±0,07	2,23±0,62	2,12±0,07	1,85±0,62	3,03±0,77

<sup>1</sup> Genes detectados por la hiperexpresión del gen *YycF* en la estirpe JNR7/87 (Mohedano et al., 2005).

<sup>2</sup> Genes detectados por la delección del gen *YycF* en la estirpe R6 (Ng et al., 2003; Ng et al., 2005).

<sup>3</sup> La inserción *yycG::kan* está localizada en posición 5' respecto a las sondas de DNA usadas para la detección de expresión de *yycG* y *vicX*. En consecuencia en el análisis de microarray se detecta expresión de los genes antedichos a partir del promotor del gen *kan*.

**Tabla S5. Proteínas afectadas por la inducción del gen *yycF* en una estirpe deficiente en el gen *yycG* o por la inducción de los genes *yycFG*, detectadas por análisis proteómico**

Manchas	10 min de inducción			30 min de inducción			Inducción continuada				
	( <i>yycG::kan</i> )[pRR]	pRRHK	Vector	( <i>yycG::kan</i> )[pRR]	pRRHK	Vector	pRRHK	Vector	TIGR4 n°	pI	Masa Molecular (kDa)
RR	8210±90	9128±376	522±164	10295±844	12627±403	446±142	16368±111	408±119	Sp1227	4,78	24,265
RR*	2589±183	2352±357	57±72	3399±414	3969±349	58±26	4412±947	59±42	Sp1227	4,71	23,251
AccC	1825±275	728±26	960±252	1695±113	762±143	662±140	770±65	652±68	Sp0425	4,85	49,793
FabF	7133±876	4091±1147	3733±907	7788±904	3314±980	3339±506	3500±1433	3450±191	Sp0422	5,45	44,075
FabK	4378±517	2130±336	1970±202	4612±442	2069±287	1998±332	1798±182	1684±273	Sp0419	5,12	34,156
FabD	2308±158	1310±18	1162±267	2745±80	1065±264	984±303	1232±269	1370±204	Sp0420	4,45	33,184
AccB	2158±28	1292±225	1169±19	2393±333	1205±242	1196±53	1283±102	1098±121	Sp0423	4,17	17,023
FabG	7378±614	3303±583	2974±403	9340±1489	3652±113	3311±594	2893±392	2900±541	Sp0421	5,34	25,739
AccA	2217±396	971±0.75	748±61	2589±479	1060±398	1206±355	689±90	809±82	Sp0427	6,31	28,230
FabF <sup>1</sup>	1603±162	616±184	454±71	1206±349	461±158	434±112	230±106	339±54	Sp0422	5,29	45,157
FabF <sup>2</sup>	836±102	547±110	512±154	1075±61	496±136	394±97	368±301	230±94	Sp0422	5,15	42,875
FabF <sup>3</sup>	1125±114	566±155	531±143	970±278	529±377	404±70	339±245	255±54	Sp0422	5,32	26,699

La denominación de las estirpes en esta tabla corresponden a JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] y a la estirpe silvestre portadora de los plásmidos [pRRHK], pRR o vector (pLS1RGFP).

<sup>1</sup>, <sup>2</sup> y <sup>3</sup> corresponden a diferentes isoformas de la misma proteína.



## **DISCUSIÓN**



## 1. Sistema de transporte y utilización de los maltosacáridos en *S. pneumoniae*

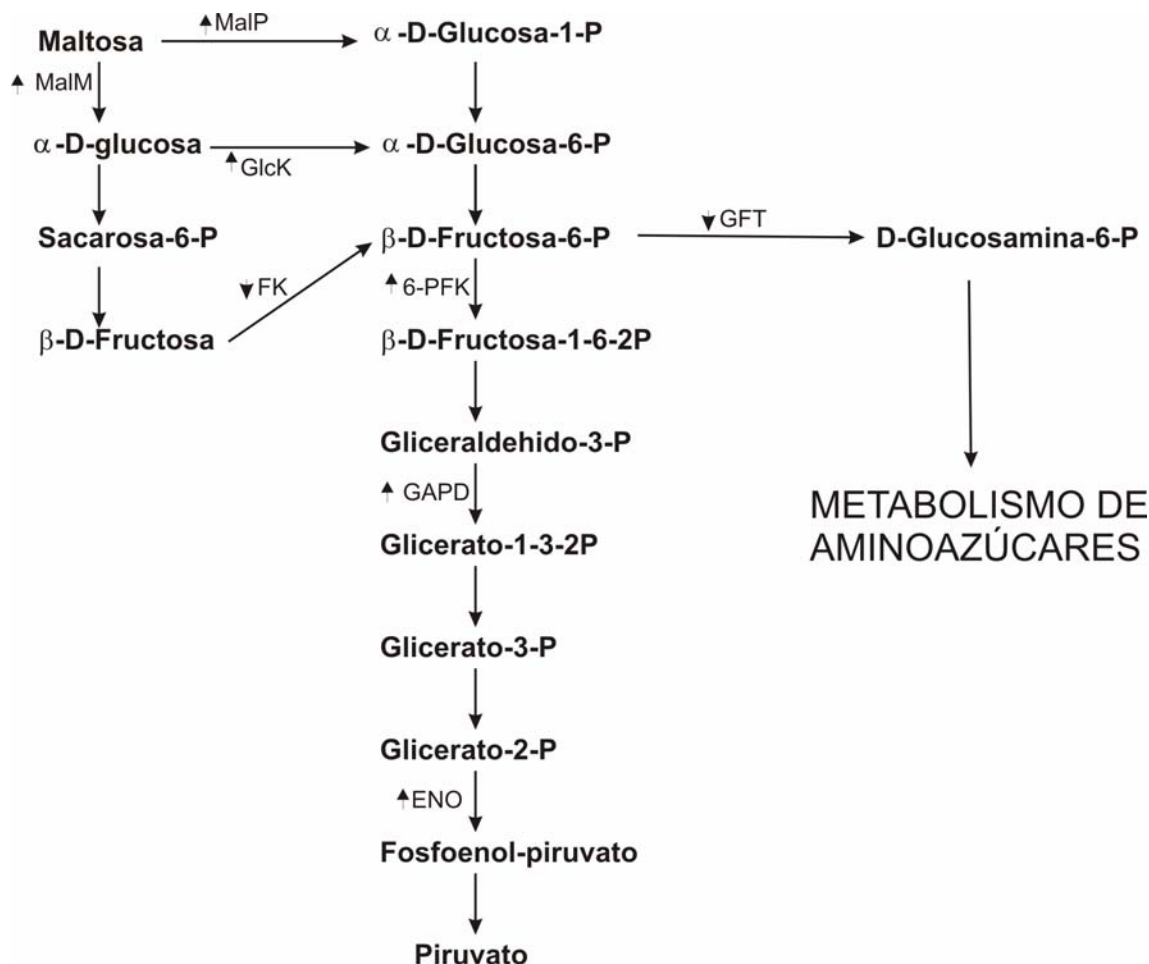
Uno de los objetivos de esta tesis es la caracterización de un sistema de expresión inducible en multicopia basado en el mecanismo de regulación de la utilización de maltosacáridos en *S. pneumoniae*, utilizando el vector pLS1RGFP (Fig. 23). Este plásmido contiene una variante del gen *gfp* bajo el promotor  $P_M$  y el gen *malR* clonado en *cis* bajo el control del promotor constitutivo  $P_{tet}$ . La expresión génica a partir del promotor  $P_M$  es inducida en presencia de maltosa en el medio de crecimiento y está controlada por el represor transcripcional MalR codificado por el gen *malR*. Al introducir este plásmido en la estirpe de *S. pneumoniae* JNR7/87 se observó que, en presencia de sacarosa como única fuente de carbono, no existía expresión a partir del promotor  $P_M$ , mientras que en presencia de maltosa como única fuente de carbono o combinada con sacarosa, existía una relación entre el tiempo de exposición a la maltosa y la expresión a partir de este promotor, detectándose dicha expresión por el aumento de la emisión de fluorescencia debida a la proteína GFP (Fig. 24) y validando la activación cuantitativa de  $P_M$  en multicopia en la estirpe JNR7/87.

Posteriormente, en este trabajo se procedió a identificar a nivel genómico y proteómico el regulón de MalR y los efectos pleiotrópicos del sistema de inducción debido al cambio de fuente de carbono por sustitución o complementación de sacarosa con maltosa. En la Figura 49 aparece recogido el metabolismo energético de la maltosa, que genera como producto final piruvato y su posible interrelación con otras rutas metabólicas, mostrándose las enzimas cuyos niveles o los de sus transcritos incrementaron al inducir la estirpe JNR7/87[pLS1RGFP] con maltosa.

Como se ha indicado en la introducción, los genes implicados en el metabolismo y transporte de maltosacáridos se encuentran organizados en tres operones: *malXCD*, *malMP* y *malAR* (Nieto et al., 1997).

El gen *malR* codifica un represor transcripcional perteneciente a la familia LacI-GalR. El gen *malA* codifica una proteína de unos 25 kDa necesaria para el crecimiento del neumococo en maltotetraosa como única fuente de carbono. Pertenece a la misma unidad transcripcional que el represor transcripcional MalR, por lo que cabe la posibilidad de que, además de su papel en la utilización de maltotetraosa, pudiera estar

implicado en la respuesta o el metabolismo de alguna molécula inductora desconocida que inactive MalR en condiciones de crecimiento diferentes (Puyet et al., 1993).



**Figura 49. Metabolismo de la maltosa y su interrelación con otras rutas metabólicas en *S. pneumoniae*.** Aparecen indicadas sólo las enzimas afectadas por la inducción del sistema de los maltosacáridos, estando todas las enzimas inducidas excepto FK, 6-FK y GFT. Las siglas de las enzimas implicadas son: MalM, amilomaltasa; MalP, maltodextrina fosforilasa; GlcK, Glucoquinasa; FK, Fructoquinasa; 6-PFK, 6-Fosfofructoquinasa; GAPD, Gliceraldehido-3-P- deshidrogenasa; ENO, enolasa; GFT, Glucosamina-fructosa-6-P aminotransferasa.

Nieto y cols. (2001) demostraron mediante estudios de interacción proteína-DNA, que el represor MalR controla la transcripción de los operones divergentes *malXCD* y *malMP* por unión a sus secuencias operadoras específicas, localizadas en la región intergénica entre  $P_x$  y  $P_M$  (Fig. 15). Además, estos autores habían mostrado previamente que, en presencia de maltosa, MalR es incapaz de unirse a sus operadores (Nieto et al. 1997). En este trabajo, el análisis transcriptómico global utilizando microarrays (Tabla S1) reveló que, en presencia de maltosa, la expresión de dichos

operones cromosomales se encuentra inducida en la estirpe JNR7/87[pLS1RGFP], confirmando *in vivo* los resultados obtenidos *in vitro* por Nieto y cols. (1997). Además, los resultados obtenidos avalan una inactivación *in vivo* de MalR codificado por pLS1RGFP en presencia de maltosa. También detectamos un incremento de la transcripción del gen cromosomal *malA*, indicativo de una posible regulación del operón *malAR*. Sin embargo, en la región promotora del operón no se detectaron las secuencias operadoras específicas de MalR, lo que sugiere que podría existir otro regulador que controle la expresión de este operón y en consecuencia los niveles de MalR.

Dentro del operón *malXCD* se encuentra el gen *malX* que codifica una proteína de membrana de unión a maltosa/maltodextrina. Esta proteína presenta similitudes con la proteína MalE de *Escherichia coli* (Puyet y Espinosa, 1993). Ambas proteínas son esencialmente hidrofílicas, con puntos isoeléctricos muy similares. MalX tiene un péptido señal similar al de otras proteínas asociadas a la membrana de *S. pneumoniae*, por lo que se ha postulado que probablemente sea una proteína anclada en el lado externo de la membrana celular (Puyet et al., 1990). Las proteínas codificadas por los genes *malC* y *malD* son similares a las proteínas MalF y MalG de *E. coli*. Estas proteínas son permeasas de membrana que pertenecen a los sistemas transportadores ABC. Se ha demostrado que MalD es una permeasa específica de maltotetraosa (Lacks, 1968), mientras que la función de MalC es aún desconocida.

Dentro del operón *malMP* se encuentra el gen *malM* que codifica la amilomaltasa, esencial para el crecimiento en maltosa. La amilomaltasa es una 4- $\alpha$ -D-glucanotransferasa, que cataliza la transferencia de una sola unidad glucosil siendo la maltosa su sustrato preferente y generando  $\alpha$ -glucosa (Lacks, 1968). La maltodextrina fosforilasa está codificada por el gen *malP*, cuya función es hidrolizar residuos glucosil del extremo no reducido de las maltodextrinas, generándose durante esta catálisis glucosa-1-P (Lacks, 1968).

La inducción con maltosa de la estirpe JNR7/87[pLS1RGFP] también conllevó a un incremento de la expresión de otras enzimas implicadas en la conversión de maltosa en piruvato (Tabla S1 y Fig. 49). Así, además de un incremento del mRNA *malMP*, se detectó un aumento de los niveles de los transcritos de GlcK, 6-PFK, GAPD y ENO, que deben favorecer la utilización catabólica de maltosa *via* glicolisis y una represión de FK que cataliza la interconversión de fructosa en fructosa-6-P. El análisis de las regiones promotoras de los genes codificantes de estas enzimas reveló la existencia de un operador putativo de MalR sólo para *glcK* (Fig. 27), indicando que este gen también

forma parte del regulón de MalR. El promotor  $P_X$ , que controla la expresión del sistema de transporte ABC de maltosa es mas fuerte que  $P_M$  (Nieto et al. 2001), por tanto es posible que cuando *S. pneumoniae* es expuesto a maltosa, niveles basales de MalX, MalC y MalD permitan la internalización del azúcar y al interaccionar con MalR su inactivación conlleve a una sobreproducción específica y coordinada del sistema de transporte de maltosa y de los enzimas MalM, MalP y GlcK. Así, esta inducción permitiría incrementar los niveles intracelulares de maltosa y su conversión en  $\alpha$ -D-glucosa-1-P y  $\alpha$ -D-glucosa-6-P, que son sustratos de la glicolisis.

Por otra parte, existen evidencias de que en la utilización de maltosacáridos por *S. pneumoniae* están implicados otros genes, además de las tres unidades transcripcionales caracterizadas hasta este momento. Las estirpes deficientes en *malXCD* poseen la capacidad de crecer en medio conteniendo maltosa, hecho indicativo de que existen genes desconocidos que codifican proteínas implicadas en la captación de maltosa en *S. pneumoniae* (Lacks, 1968). En este trabajo hemos detectado inducción, en presencia de maltosa, en la expresión de cuatro genes (SP0758, SP0636, SP0061 y SP0062) implicados en el transporte de azúcares y que contienen en sus regiones promotoras, operadores putativos de MalR (Fig. 27).

En *E. coli* existen dos mecanismos de transporte de maltosa, el sistema de transporte ABC homólogo al *MalXCD* de *S. pneumoniae* y los sistemas de fosfotransferencia fosfoenol piruvato-carbohidrato (PTS) (Reidl y Boos, 1991). En *S. pneumoniae* se han identificado por homología un gran número de sistemas PTS, pero, todavía no se ha caracterizado ni identificado ninguno específico de maltosa. Sin embargo, recientemente si se han caracterizado sistemas PTS específicos de maltosa en bacterias gram positivas. En *B. subtilis* la maltosa es captada a través de un sistema PTS denominado MalP (Schonert et al., 2006). Tanto en *E. faecalis* (Le Breton et al., 2005) como en *Streptococcus mutans* (Webb et al., 2007) existe el sistema PTS denominado MalT, cuyo sustrato preferente es la maltosa. Además, Le Breton y cols. (2005) han demostrado que la inactivación de *malT* en *E. faecalis* impide el crecimiento de la bacteria en presencia de maltosa. En este trabajo hemos identificado al gen SP0758 como un posible miembro del regulón de MalR. Su producto génico está anotado en el banco de datos como un sistema de transporte PTS de azúcar. El análisis de su secuencia de aminoácidos con el programa BLAST reveló que esta proteína posee una homología significativa con una identidad aproximada del 70 % con los sistemas de

transporte MalT específico de maltosa de *E. faecalis* y *S. mutans*. Este resultado sugiere que el producto de SP0758 es el transportador MalT de *S. pneumoniae*.

También hemos detectado que la expresión de los genes SP0060, SP0061 y SP0062 se induce por la presencia de maltosa y que el promotor putativo de este posible operón contiene un operador de MalR. SP0060 codifica la  $\beta$ -galactosidasa BgaC, mientras que SP0061 y SP0062 codifican respectivamente los componentes EIIB y EIIC de un sistema PTS de transporte de azúcares. La organización génica, la activación conjunta de los genes y la funcionalidad del producto de SP0060 sugieren que MalR regularía un operón implicado en el transporte y metabolismo de la lactosa en *S. pneumoniae*, y que esta activación conjunta posiblemente tenga lugar cuando la bacteria coloniza el tracto nasofaríngeo humano y está expuesta a los maltosacáridos y a la lactosa presentes en los alimentos como por ejem. cereales mezclados con leche.

Finalmente, nuestro análisis transcriptómico y la detección de operadores putativos de MalR indican que también son miembros del regulón de MalR los genes codificantes de una  $\alpha$ -amilasa, responsable de la conversión de 1,4- $\alpha$ -D-glucanos a maltodextrinas, de una amilopululunasa implicada en la conversión de almidón en dextrinas y de DexB, que es una glucano  $\alpha$ -1,6 glucosidasa implicada en el metabolismo de maltosacáridos.

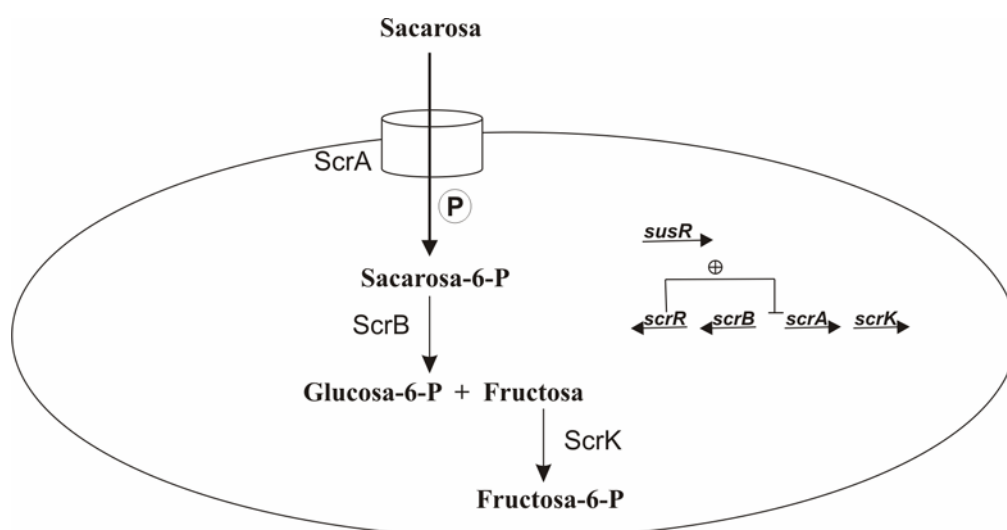
Como resumen de todo lo antedicho y con la detección de alteración de la expresión de otros genes (Tabla S1) postulamos la existencia de varios mecanismos de internalización y de flujos metabólicos de maltosacáridos en *S. pneumoniae* inducidos por la inactivación de MalR (Fig. 49). Por una parte, la maltosa transportada por el sistema ABC sería transformada en glucosa por MalM o por MalP en glucosa y glucosa-1-P. Este azúcar fosforilado serviría de sustrato junto con la glucosa convertida en glucosa-6-P por GlcK para la glicolisis. En esta ruta metabólica su producto intermediario, la fructosa-6-P, puede servir de sustrato de la FK para generar fructosa o de la GTF para la formación de xilulosa-5-P (sustrato de la ruta metabólica de aminoazúcares). Sin embargo, la represión observada en la expresión de los genes codificantes de dichas enzimas durante la inducción con maltosa (Tabla S1) indica que sólo la glicolisis es potenciada durante la utilización de maltosacáridos. Alternativamente, la maltosa también puede ser transformada en maltodextrinas por la  $\alpha$ -amilasa (SP1382), que pueden ser convertidas en glucosa por DexB o por la amilopululunasa. Finalmente, la maltosa podría ser transportada al interior celular por

sistema PTS MalT como maltosa-6-P. Esta maltosa-6-P podría ser convertida a glucosa-6-P por una maltosa fosforilasa hidrolasa y así entrar en la glicolisis. Sin embargo, dicho enzima no ha sido identificado en *S. pneumoniae*. Nuestro análisis transcriptómico (Tabla S1) ha revelado que la transcripción de *dexS*, que codifica la trehalosa-6-P hidrolasa DexS, se induce por la presencia de maltosa. Este hecho sugiere que MalT podría ser un transportador de la  $\alpha\alpha$ -trehalosa al citoplasma celular en forma de  $\alpha\alpha$ -trehalosa-6-P y servir de sustrato de DexS para la síntesis de glucosa-6-P. Además, también se observó un incremento de la expresión de *treP*, cuyo producto está anotado como un transportador PTS de trehalosa, apoyando la inducción de la utilización de este azúcar en presencia de maltosa, aunque no podemos descartar que la maltosa utilizada por nosotros aunque tiene un alto grado de pureza y teóricamente no contiene otros azúcares esté contaminada con trehalosa.

Los cambios metabólicos antedichos relacionados directamente con el metabolismo de maltosacáridos fueron detectados en la estirpe JNR7/87[pLS1RGFP] tanto en condiciones de eliminación de la sacarosa del medio de cultivo o como de su complementación con maltosa, siendo mas pronunciados en el primer caso. Además, sólo se observó la represión de genes implicados en la utilización de sacarosa, cuando los cultivos se sometieron a una inducción transitoria y no se detectó durante la inducción continuada en presencia de sacarosa y maltosa. Estos resultados eran esperables teniendo en cuenta que en la primera situación nos encontramos en un caso típico de represión por cambio de azúcar como fuente de carbono, siendo el prototipo de esta regulación la del operón *lac* de *E. coli* (Jacob y Monod, 1961). El prototipo de esta respuesta es *Saccharomyces cerevisiae*, donde se comprobó que cultivos adaptados a un crecimiento en presencia de galactosa rápidamente perdieron la adaptación cuando fueron expuestas a glucosa o fructosa (Deutscher et al., 2006). Ese fenómeno se conoce como el efecto glucosa y nos indica que existe una jerarquía para la utilización de fuentes de carbono, estando a la cabeza de la jerarquía los monosacáridos glucosa y fructosa y el disacárido sacarosa, de forma que los organismos utilizan estas fuentes de carbono antes de iniciar el transporte y metabolismo de las fuentes de carbono “menos favorables”. Así, en el caso de la inducción continuada, nuestros resultados indican que *S. pneumoniae* prefiere la utilización de la sacarosa frente a la maltosa y por tanto no reprime la utilización del primer azúcar e induce sólo parcialmente la utilización del segundo.



Las alteraciones detectadas durante la inducción transitoria relacionadas con la utilización de la sacarosa (Tabla S1) fueron las siguientes. Por una parte se observó la represión de la expresión de los genes implicados en la captación (SP1722) y metabolismo de la sacarosa como fuente de carbono (SP1721-SP1725 y SP1799). El gen *scrA* (SP1722) codifica el sistema PTS específico de sacarosa y los genes *scrB* (SP1724) y *scrK* (SP1721) codifican enzimas implicadas en la conversión de sacarosa a fructosa-6-P, que posteriormente es transformada en piruvato a través de la ruta de la glicólisis (Iyer y Camilli, 2007). Además, se detectó una represión de la expresión de los genes *scrR* (SP1725) y *susR* (SP1799), que codifican reguladores positivos de los genes implicados en el metabolismo de sacarosa (Fig. 50). La proteína codificada por el gen *aga* (SP1898) es una  $\alpha$ -galactosidasa que se reprime en presencia de sacarosa, encontrándose inducida en presencia del resto de azúcares (Rosenow et al., 1999).



**Figura 50. Mecanismo de transporte y metabolismo de la sacarosa en *S. pneumoniae*.** La sacarosa es transportada al citoplasma bacteriano y convertida en sacarosa-6-P por el sistema PTS específico de sacarosa ScrA. Una vez internalizada, la sacarosa-6-P provoca la desrepresión del sistema *scr* permitiendo la expresión de las proteínas ScrB y ScrK.

No se observaron operadores de MalR en las regiones operadoras de los genes antedichos, indicativo de que este represor no controla directamente su expresión y que es la ausencia de sacarosa el efector que controla la expresión de SusR y su circuito regulatorio, como se ha demostrado previamente (Iyer y Camilli, 2007).

Finalmente, durante la inducción transitoria con maltosa hemos detectado la inducción de todos los genes implicados en la biosíntesis de purinas (Tabla S1),

posiblemente debido a que, al inducir el sistema, existe un aumento de la transcripción de un gran número de genes implicados en la utilización de maltosacáridos y se requiere la síntesis de los ribonucleótidos sustratos de dicho proceso.

## 2. Hiperexpresión del SDC esencial de *S. pneumoniae*

Para investigar la función reguladora de YycFG, hemos construido en este trabajo dos plásmidos denominados pRR y pRRHK, que permiten la expresión inducible por maltosa respectivamente de *yycF* y de *yycFG*. La influencia de la producción YycF ha sido estudiada en la estirpe capsulada JNR7/87 silvestre y en un mutante isogénico que contiene la inserción *yycG::kan* con el objeto de evidenciar *in vivo* las funciones de YycF no fosforilado. Además, el efecto de la sobreproducción de YycF fosforilado ha sido investigado en la estirpe JNR7/87[pRRHK]. Para realizar el estudio se ha realizado una combinación de análisis proteómicos y transcriptómicos en distintas condiciones de inducción con maltosa, analizando así tanto la respuesta temprana como la respuesta adaptativa de *S. pneumoniae* a cambios en el SDC.

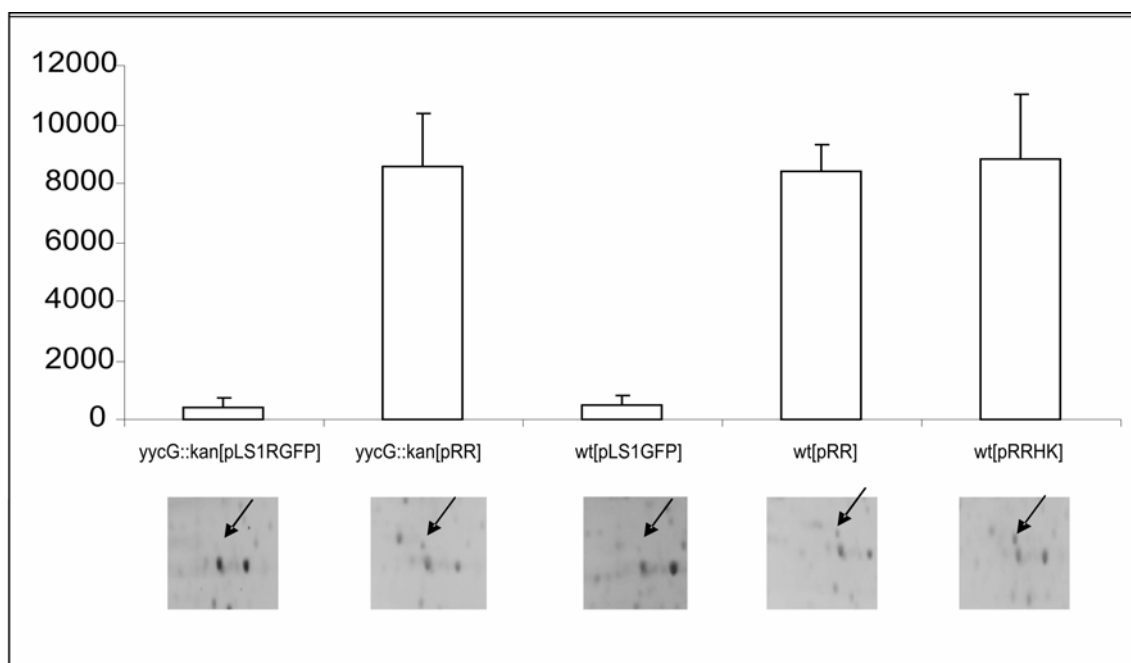
La expresión inducible de *yycG* y/o *yycF* a partir de los plásmidos pRRHK o pRR fue detectada en todas las estirpes estudiadas tanto por mediciones de fluorescencia de GFP coexpresada junto con el SDC (Fig. 29 y resultados no mostrado) como por detección de niveles de los transcritos utilizando microarrays (Tablas. S2, S3 y S4). Los resultados obtenidos mostraron que los niveles de expresión dependían del tiempo y condiciones de inducción y eran similares en todas las estirpes analizadas.

La mayoría de las HK de los SDC son proteínas de membrana. Sin embargo, el análisis de la localización celular de YycG de *S. pneumoniae* (Fig. 6 y resultados no mostrados) reveló que sólo posee una corta región transmembranal de 4-12 aminoácidos en su extremo amino terminal. Por ese motivo, con el objeto de determinar la localización de la HK en forma activa en la estirpe JNR7/87[pRRHK] se realizaron ensayos de autofosforilación tanto de la fracción correspondiente a las vesículas de membrana como de la fracción citosólica de extractos protéicos totales. Se detectó una banda cuya masa molecular corresponde a la de la proteína YycG, tan sólo en la fracción de membrana de cultivos portadores de pRRHK (Fig. 37A). Estos resultados indicaron que la hiperexpresión del gen *yycG* provoca la síntesis de niveles elevados de YycG capaz de insertarse en la membrana de *S. pneumoniae* en forma activa y

funcional. La predicción de la localización celular de la proteína YycF indica que es una proteína citosólica. Así, como era de esperar el análisis de los extractos protéicos de la estirpe portadora del plásmido pRRHK, mediante hibridación de western con anticuerpos desarrollados frente a YycF, reveló la presencia mayoritaria de la proteína en la fracción citosólica en niveles muy superiores a los detectados en la estirpe control (Fig. 37B). Además, también fue detectada YycF en la fracción de membrana. Este hecho podría ser debido a un atrapamiento de proteínas citosólicas en las vesículas membranosas durante la preparación de ellas. Sin embargo, el análisis en geles 2D de preparaciones de membranas linearizadas (Fig. 51) mostró la presencia de la proteína YycF en los extractos de todas las estirpes estudiadas, siendo muy superior sus niveles en aquellas en las que el gen *yycF* estaba sobreexpresado. Estos resultados indican que una fracción de YycF puede estar unida a membrana quizás durante su interacción con YycG durante el proceso de su fosforilación o con otras HK, ya que se ha mostrado *in vitro* la fosforilación del regulador por la HK de especies enterocócicas (Wagner y cols. 2002) o en su interacción con proteínas auxiliares del SDC. Apoyando la segunda hipótesis, la esencialidad de YycF y no de YycG sugiere que el RR puede actuar independientemente de su HK, posiblemente participando en la transducción de señal con otras proteínas neumocócicas. Estudios recientes han revelado que los SDC a menudo incluyen varias proteínas auxiliares que tienen efectos regulatorios sobre YycFG (Szurmant y cols. 2007). Un candidato, es la proteína VicX con motivos de unión a zinc HxHxD de función desconocida. Su gen codificante *vicX* (también denominado *yycJ*) ha sido identificado en todos los operones YycFG de bacterias gram positivas. Además, en *S. pneumoniae* VicX es requerido para el crecimiento bacteriano sólo cuando los niveles de YycF están reducidos y la expresión constitutiva de *vicX* atenúa los defectos de los mutantes neumocócicos carentes de *yycG* (Throup y cols. 2000; Ng y cols. 2003).

Por otra parte, el análisis proteómico en geles bidimensionales de extractos protéicos totales de las estirpes portadoras de los plásmidos pRR (Fig. 34) o pRRHK (Fig. 38) teñidos con SyproRubi reveló la existencia de dos manchas protéicas que fueron identificadas como la proteína YycF por análisis de MALDI-TOF de sus digeridos tripticos. El polipéptido mas abundante (RR) mostraba un pI de 4,71, mientras que el polipéptido minoritario (RR\*) poseía un pI de 4,78. Inicialmente propusimos que RR\* podría ser la forma fosforilada de YycF y que el fosfato unido al regulador sería el responsable de la modificación de su punto isoelectrico (Mohedano et al. 2005). Sin

embargo, la movilidad relativa de RR\* y RR en geles 2D también indicaba la existencia de diferencia en la masa molecular de los polipéptidos, siendo su valor estimado de 24,3 kDa para RR (la masa molecular esperada para YycF) y de 23,2 kDa para RR\*. El análisis de MALDI-TOF del digerido trípico de RR\* confirmó que carece de la región carboxilo terminal de YycF, mostrando este resultado que el polipéptido es un fragmento proteolítico del RR. Los niveles detectados de RR\* en las distintas estirpes analizadas y sobreproductoras de YycF fueron similares, indicando una posible proteólisis específica producida *in vivo* o durante la preparación de los extractos. Sin embargo, la posible funcionalidad de RR\*, si existe, es desconocida en la actualidad.



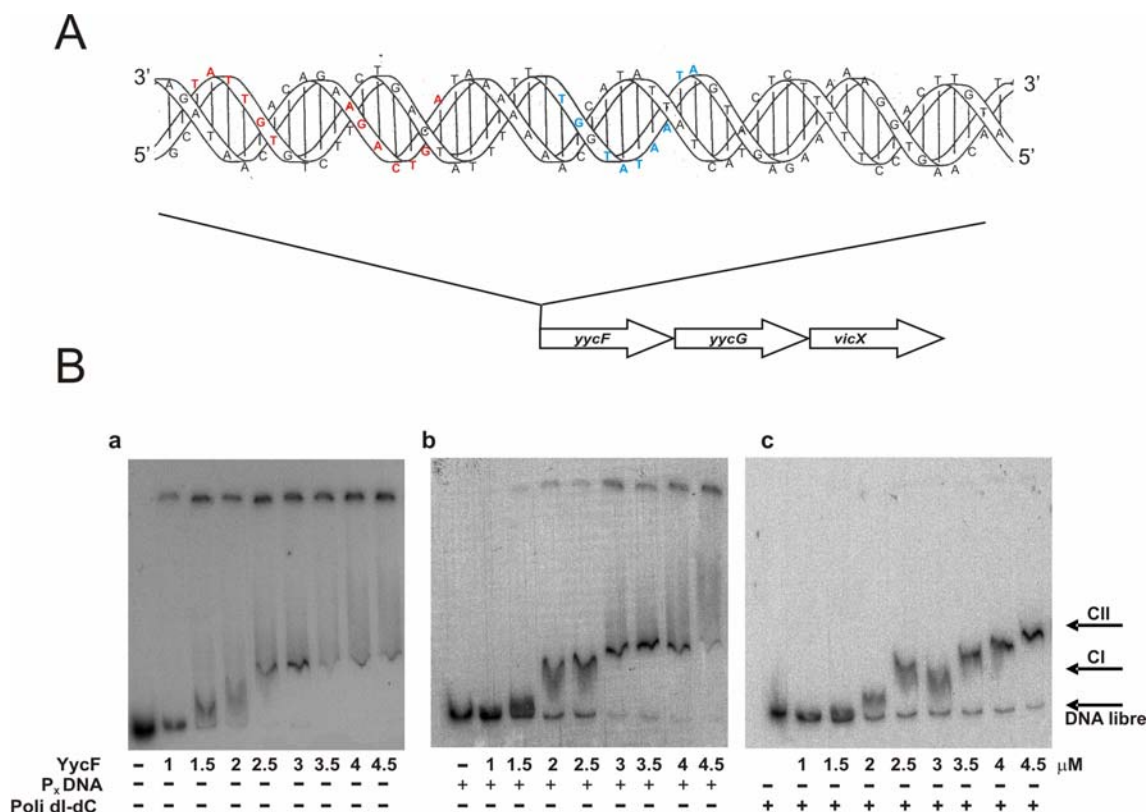
**Figura 51. Detección de YycF en preparaciones de membranas linearizadas.** En la figura se muestran los niveles relativos de YycF en las distintas estirpes analizadas determinados por cuantificación de las manchas proteicas después de su fraccionamiento en geles 2D.

### 3. Autorregulación del SDC esencial de *S. pneumoniae*

El análisis transcriptómico de la estirpe JNR7/87[pRR] utilizando microarrays reveló que la inducción de la expresión de YycF desde el plásmido pRR provoca un incremento de la transcripción del gen cromosomal *yycG* (Tablas S2 y S3). Este resultado junto con el hecho de que *yycF* e *yycG* están localizados en el mismo operón

(Wagner et al., 2002), sugirió que *yycF* autorregula su propia expresión. Esta hipótesis fue apoyada por el análisis del mRNA del SDC mediante las técnicas de extensión del cebador (Fig. 32), y de RT-PCR semicuantitativa (Fig. 33A y 33C), al detectarse un incremento del transcrito *yycFG* cromosomal sintetizado a partir de su promotor natural. Wagner y colaboradores (2002) propusieron que, en la estirpe de *S. pneumoniae* R6, *yycF* es el primer gen de un operón que comprende también los genes *yycG* y *vicX*. Tanto el análisis transcriptómico por microarrays como el análisis de RT-PCR semicuantitativa, realizados en este trabajo, mostraron que la sobreproducción de YycF no conllevaba el incremento de mRNA conteniendo el gen *vicX*. Este resultado es inconsistente con la estructura del operón propuesta por Wagner y cols. (Wagner et al., 2002). Sin embargo, la evidencia de que *vicX* es co-transcrito con *yycFG* procede de un experimento de hibridación de Northern en el que se detectó el mRNA *yycFG-vicX* cuando se expresaba a partir de un promotor fuerte y en multicopia. (Wagner et al., 2002). Además, los autores del trabajo fueron incapaces de detectar el transcrito codificado por el cromosoma neumocócico. Por tanto, es posible que el mRNA detectado no refleje la situación natural y que la transcripción de *vicX* no esté acoplada a la de *yycFG*. Así, los resultados de Wagner y cols (2002) podrían ser debidos a la existencia de un terminador transcripcional débil entre *yycG* y *vicX*, que sería obviado por la RNA polimerasa cuando transcribe a partir de un promotor fuerte y que un promotor débil localizado delante de *vicX* genere un transcrito minoritario no detectable por hibridación de Northern. Sin embargo, no podemos descartar que nuestra incapacidad de detectar por RT-PCR un transcrito policistrónico que incluya los genes *yycF*, *yycG* y *vicX* o detectar incremento del mRNA de *vicX* por análisis de microarray sea debido a la existencia de un sitio de procesamiento específico de RNAsas localizado entre *yycG* y *vicX*, que conlleve la generación de una especie de RNA conteniendo *vicX* de vida media muy corta y que sea difícil de detectar por las técnicas que nosotros hemos empleado.

La determinación del extremo 5' del transcrito del SDC por la técnica de extensión del cebador nos permitió identificar la secuencia promotora del SDC YycFG cromosomal (Fig. 53A), conteniendo una región -10 extendida canónica (5'-TGNTATAAT-3') característica del sitio de reconocimiento del factor  $\sigma$  vegetativo de las bacterias gram positivas. Para analizar una posible autorregulación de la proteína YycF sobre su promotor, se realizaron ensayos de unión del regulador no fosforilado al DNA que contiene la región promotora del SDC YycFG (Fig. 53B).



**Figura 53. Análisis de interacción de YycF y la región promotora de SDC YycFG.** (A) Genes potencialmente implicados en el SDC de *S. pneumoniae*, en la que se ha representado la región promotora del SDC. En azul se encuentra marcada la región -10 y en rojo la posible secuencia consenso de reconocimiento del DNA de la proteína YycF (B) En la figura se muestran los ensayos de retardo en gel con el fragmento de la región promotora del SDC. Las reacciones contenían una concentración de 1 nM del fragmento SDC02bind marcado radiativamente con [ $\alpha^{32}$ P] dCTP y se llevaron a cabo a distintas concentraciones de proteína y sin DNA competidor (a), o con poli dI-dC (b) o un fragmento inespecífico que contiene el promotor P<sub>x</sub> de *S. pneumoniae* (c) como competidores inespecíficos. En la imagen se indican los complejos obtenidos en todos los casos.

En la unión de YycF al fragmento SDC02bind se observaron dos complejos específicos denominados CI y CII con distinta movilidad (Fig. 55B). Como nuestros resultados de ultracentrifugación analítica (Fig. 46) mostraron que nuestra proteína está en forma monomérica y no fosforilada, la presencia de los dos complejos y el patrón de aparición de ellos sugieren que CI es el resultado de la unión de un monómero de YycF al DNA, y que CII es el resultado de la unión de dos monómeros de YycF al DNA.

En base a estudios de interacción proteína-DNA en *B. subtilis* y *S. aureus* (Howell et al., 2003; Dubrac y Msadek, 2004) se ha propuesto que la secuencia de reconocimiento de los reguladores YycF de bacterias gram positivas está formada por dos repeticiones directas constituidas por dos hexanucleótidos separados por cinco nucleótidos, siendo la secuencia consenso de unión al DNA 5'-TGTWAH-N5-TGTWAH-3'. Esta secuencia es similar a la consenso propuesta por Ng y cols. (2005)

para YycF de *S. pneumoniae* (TGTNAN-N5-NGTNANA), que contiene un hexámero y un heptámero separados por 5 nucleótidos. Al analizar la región localizada corriente arriba del P<sub>YycFG</sub> observamos que, en la cadena codificante del DNA existe un hexámero de reconocimiento para YycF (TGTGGT), mientras que el heptámero se encuentra en la cadena no codificante del DNA (AGTCAGA), estando situadas ambas secuencias en la misma cara del DNA y a una distancia de 5 nucleótidos (Fig. 53A). Los operadores putativos de YycF están localizados entre la posición -37 y -23 y además el promotor P<sub>YycFG</sub> carece de una región -35. Estos hechos, junto con los resultados obtenidos en los análisis transcripcionales, apoyan una función activadora de YycF sobre la transcripción del SDC.

Por otra parte, la proteína YycF presenta mayor afinidad por su propia región promotora que por la región promotora de FabT (Fig. 47). Sin embargo, esta mayor afinidad no parece generar complejos más estables, ya que tanto en este caso como en los estudios de unión a la región promotora de FabT se observó una migración difusa en los geles de PAA. Estos complejos difusos son característicos de los ensayos de unión de la proteína-DNA con YycF procedente de distintos orígenes bacterianos (Howell et al., 2003; Dubrac y Msadek, 2004). Una posible explicación a este hecho es que la formación de complejos estables de YycF con sus operadores requiera la presencia de proteínas auxiliares todavía no identificadas y que en ausencia de ellas la constante de disociación sea muy elevada. De hecho aunque hemos probado distintas condiciones experimentales, siempre hemos observado la disociación de YycF del DNA durante la migración en los geles de PAA. Independientemente de estos problemas analíticos, nuestros resultados apoyan que YycF autorregula su propia expresión. Nuestra incapacidad para obtener YycF fosforilado en forma soluble nos ha impedido analizar *in vitro* la interacción de esta forma del regulador con su promotor. Además, la existencia del gen *yycG* en multicopia en la estirpe JNR7/87[pRRHK] y la presencia de la inserción *kan* portadora de un promotor transcripcional en el cromosoma de JNR7/87(*yycG::kan*)[pRR] nos ha impedido analizar *in vivo* la influencia de YycG en el proceso de autorregulación. Sin embargo, tenemos que resaltar que nuestra estrategia de sobreproducir YycF en multicopia, en lugar de disminuir su expresión cromosómica utilizando promotores heterólogos (Ng y cols. 2003 y 2004), complementada con los estudios de interacción proteína-DNA, nos han permitido detectar el autocontrol transcripcional de YycF en *S. pneumoniae*.

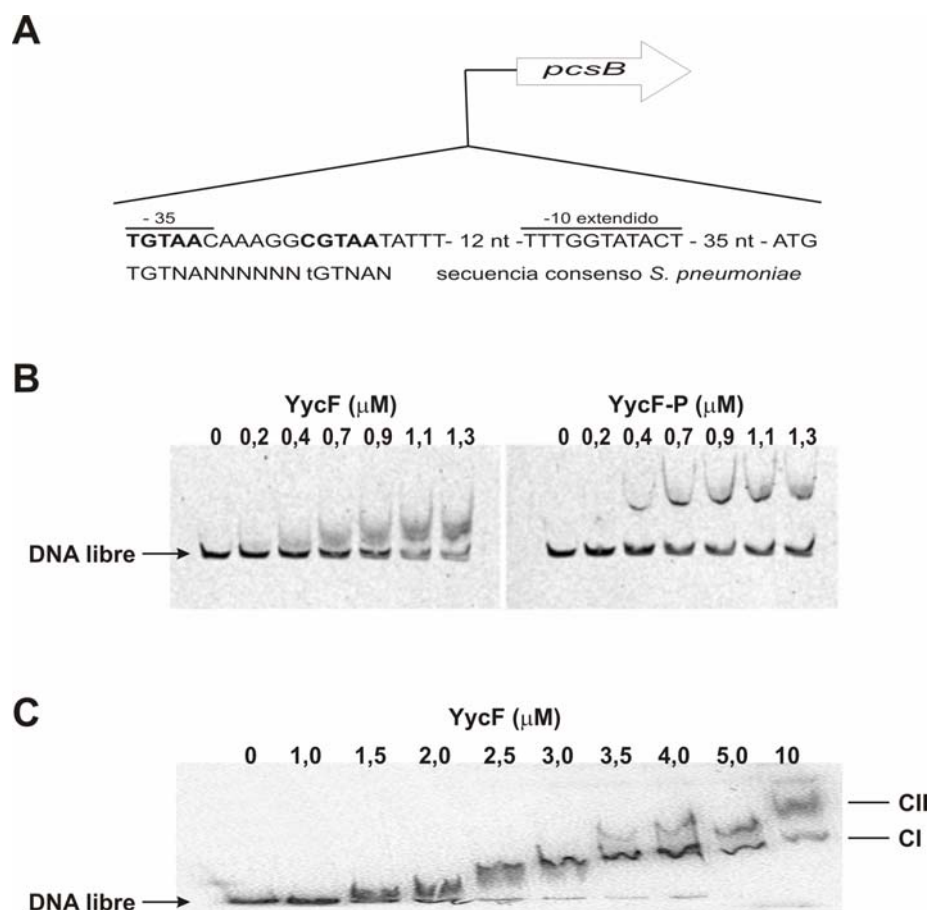
#### 4. El SDC esencial de *S. pneumoniae* controla el metabolismo de la pared celular

El análisis transcriptómico de las estirpes con niveles alterados del SDC YycFG reveló en todas ellas la existencia de alteraciones en la expresión de los genes implicados en el metabolismo de la pared celular (Tablas S2, S3 y S4). En concreto se detectó un incremento de la transcripción de los genes *pcsB*, *lytB* y de otros dos genes (SP0107 y SP2063), que también codifican proteínas que contienen dominios LysM de unión a la pared celular. También se detectó una disminución de los niveles de expresión de los genes *mreCD* implicados en la morfogénesis celular en bacterias gram negativas y gram positivas (Osborn y Rothfield, 2007; Hayhurst et al., 2008). Estos resultados están correlacionados con los obtenidos por Ng y cols. (2003 y 2004), que detectaron una respuesta contraria y complementaria en los niveles de la expresión de la mayoría de los genes antedichos cuando disminuyó la expresión del SDC cromosomal en la estirpe R6, utilizando el promotor regulable del operón implicado en la utilización de fucosa. Además, tanto con la hiperproducción (Mohedano et al., 2005) como con la disminución (Ng et al., 2003) de los niveles del SDC YycFG, se han detectado alteraciones en la morfología de las células, produciéndose una acumulación anómala del DNA (Fig. 30 y 36) (Ng y Winkler, 2004; Gieffing et al., 2008). Estas alteraciones morfológicas son similares a las observadas cuando en las células se reducen los niveles de PcsB (Ng et al., 2004), una putativa mureína hidrolasa localizada en la membrana plasmática y que se libera al medio de cultivo (Mills et al., 2007).

Ng y cols. (2005) demostraron que existe una regulación directa de YycF sobre PcsB detectando, por ensayos de footprinting utilizando DNasa I, una región protegida por YycF en la región promotora de *pcsB* que contiene la secuencia de reconocimiento de DNA (5'-TGTAAC-N5-CGTAATA-3') (Fig. 54A). Ensayos de retraso en gel realizados por el grupo del Dr. Winkler mostraron que YycF en sus dos formas (fosforilada y sin fosforilar) podía unirse a la región promotora de *pcsB*, postulando que la unión de YycF fosforilado era mucho más fuerte y específica, aunque no calcularon las constantes de afinidad. Además, los ensayos mostrados en su trabajo revelan un complejo diferente para las dos formas de YycF, teniendo menor movilidad electroforética el complejo obtenido con la forma fosforilada del regulador (Ng et al., 2005 y Fig. 54B). En la figura 54C se muestran retrasos en gel realizados por nosotros utilizando la proteína YycF no fosforilada y el mismo fragmento de DNA que dichos



autores y que contiene la región promotora de PcsB, aunque nuestros ensayos se realizaron en presencia de una concentración mas elevada de NaCl para evitar la insolubilización de la proteína. Los resultados obtenidos han confirmado que el RR se une específicamente a la región promotora. En estos ensayos se han utilizado concentraciones más altas de YycF, lo que nos ha permitido observar la formación de dos complejos YycF-DNA. Ya que nuestra proteína está en forma monomérica la presencia de los dos complejos (CI y CII) y el patrón de aparición de ellos sugiere que el CI es el resultado de la unión de un monómero de YycF al DNA, y que el CII es el resultado de la unión cooperativa de dos monómeros de YycF al DNA.



**Figura 54. Interacción de la región promotora de PcsB con la proteína YycF.** En la figura se muestran los ensayos de retardo en gel con un fragmento de 228 nt (A) incluyendo la región promotora de PcsB. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando distintas concentraciones de proteína y usando como DNA competidor poli dI-dC. (B) Análisis reproducida de la publicación de Ng y cols. (2005), (C) utilizando YycF purificado por nosotros y usando poli dI-dC como DNA competidor.

Ng y cols. (2005) fosforilaron *in vitro* la proteína YycF utilizando acetil fosfato como donador. Anteriormente a dicho trabajo, se habían realizaron ensayos de fosforilación no enzimática de la proteína YycF de *B. subtilis*, siendo todos los intentos fallidos (Blue y Mitchell, 2003). La validación de la fosforilación química de YycF neumocócico fue realizada por Ng y cols. (2005) mediante el análisis de las reacciones por HPLC con una columna C4, al observarse un cambio en el tiempo de elución de la proteína. Nosotros fosforilamos y analizamos la proteína YycF purificada en forma soluble y monomérica (Fig. 46) en las mismas condiciones que el grupo del Dr. Winkler y obtuvimos el mismo tipo de resultado (Fig. 42), que el descrito por estos autores. Este hecho nos indicó que existía fosforilación de YycF. Sin embargo, el análisis por MALDI-TOF de las reacciones de fosforilación reveló que la proteína fosforilada químicamente contenía dos fosfatos (Fig. 45), y además los análisis por ultracentrifugación analítica revelaron que la proteína estaba en forma insoluble. Por ese motivo no realizamos estudios de interacción proteína DNA con YycF fosforilado.

Como ya se ha indicado en la Introducción, YycF es un regulador de respuesta perteneciente a la familia OmpR/PhoB, mostrando sus miembros no sólo estructuras similares tanto en los dominios receptor y efector, sino que también es común en ellos que la forma activa sea dimérica (Bachhawat et al., 2005; Toro-Roman et al., 2005a; Toro-Roman et al., 2005b) . Además, en la mayoría de los RR, incluido PhoB, la fosforilación promueve la formación de dímeros (Mack y Piscataway, 2008). También, la secuencia de la región  $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$  implicada en la dimerización está altamente conservada en la subfamilia OmpR/PhoB, incluyendo a YycF. Finalmente, se ha obtenido un dímero cristalográfico utilizando el dominio receptor de YycF neumocócico, a una concentración de 10 mg/ml de la proteína (Bent et al., 2004). Por lo tanto, es de esperar que la proteína silvestre YycF conteniendo tanto el dominio efector como receptor, pueda dimerizar. En base a estos antecedentes y a nuestros resultados interpretamos que posiblemente el complejo YycF-P-DNA esté constituido por la unión del dímero al DNA, reconociendo cada motivo hélice-alfa-hélice alada (winged helix) de un monómero un único operador consenso (un hexámero o un heptámero). Además, es factible que la preparación de YycF fosforilado utilizada por el grupo del Dr. Winkler contuviera una concentración de proteína soluble inferior a la utilizada en los ensayos con el regulador no fosforilado monomérico y por ello YycF-P mostraría una aparente menor afinidad por el promotor que la forma no fosforilada.

En *S. pyogenes* y *S. mutans*, el SDC YycFG también controla el metabolismo de pared celular, regulando la expresión de homólogos de la proteína PcsB (Senadheera et al., 2005; Liu et al., 2006). En *B. subtilis*, YycF activa tanto la expresión de *yocH*, *yvcE* y *lytE*, genes codificantes de autolisinas que intervienen en la degradación de la pared celular (Howell et al., 2003), como de *ftsAZ*, genes implicados en la división celular (Fukuchi et al., 2000; Fukushima et al., 2008). En *S. aureus*, YycFG también controla el metabolismo de la pared celular, regulando positivamente la expresión de sus dos principales autolisinas, AtlA y LytM (Dubrac et al., 2007). Una función inesperada de las autolisinas es su implicación en la formación de biofilms, debido a que estas enzimas provocan lisis celular, liberando así DNA exógeno que es el mejor componente estructural para el establecimiento inicial y el desarrollo de los biofilms (Spoering y Gilmore, 2006). En *S. aureus* se ha demostrado que el SDC YycFG controla positivamente la formación de biofilms (Dubrac et al., 2007), al igual que en *S. mutans* (Senadheera et al., 2005). En *S. pneumoniae* YycF controla la expresión de LytB y se ha demostrado que alteraciones en esta acetilglucosaminidasa, afectan a la capacidad de esta bacteria para formar biofilms (Moscoso et al., 2006). Además, LytB es la enzima responsable de la separación de las células durante la división celular (De Las Rivas et al., 2002), de forma que mutaciones en esta enzima provocan la formación de largas cadenas neumocócica, que limitan la diseminación de las bacterias durante la infección. Por tanto, se cree que LytB desempeña un papel en la patogénesis, siendo los mutantes deficientes en esta enzima incapaces de colonizar el tracto nasofaríngeo (Gosink et al., 2000). Como YycFG regula positivamente LytB, que es una enzima clave implicada en la división celular y que juega un papel en patogénesis, este SDC puede ser una diana interesante para la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos (Trappetti et al., 2009). Además, alteraciones y deleciones en este SDC provocan la atenuación de la virulencia en infecciones intraperitoneales (Wagner et al., 2002).

Así, los resultados obtenidos en distintas bacterias gram positivas muestran claramente un papel primordial de YycFG tanto en el metabolismo de la pared como en la división celular. En algunas de estas bacterias también afectaría a la formación de biofilms.

En *S. pneumoniae* la expresión constitutiva de *pcsB* elimina los requerimientos de regulación positiva del SDC YycFG, y permite la deleción del gen *yycF* (Ng y cols. 2003). Sin embargo, ya que se ha propuesto que es la forma fosforilada de YycF la que es responsable y nuestros experimentos *in vivo* y los de otros autores sugieren que este

es el caso, una cuestión que quedaría por resolver es porque en *S. pneumoniae*, a diferencia de otros sistemas bacterianos, YycG no es esencial.

## 5. El SDC esencial de *S. pneumoniae* regula la expresión de la biosíntesis de ácidos grasos

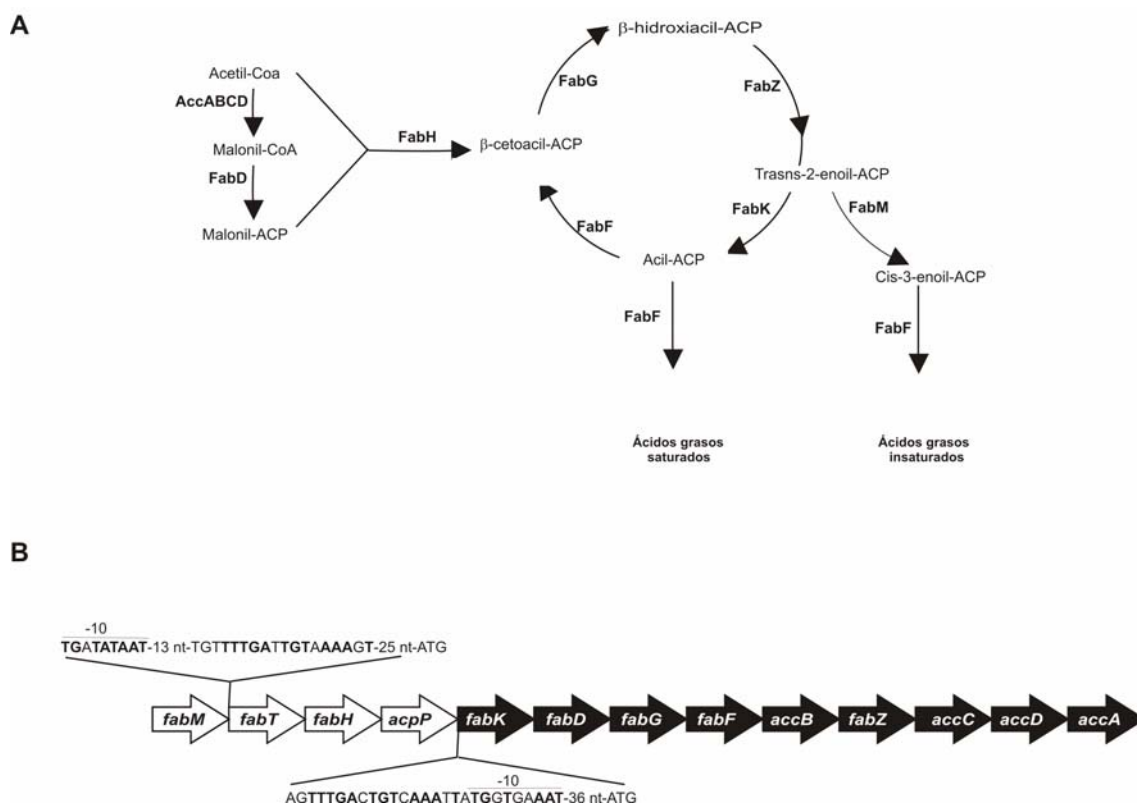
Una respuesta universal de adaptación a los diferentes cambios medioambientales que se observa en numerosas bacterias, es la modificación de la composición de lípidos de membrana. La respuesta general de ciertas estirpes o especies termotolerantes a un aumento de temperatura o a estrés oxidativo, es un aumento del grado de insaturación o un descenso de la longitud de los ácidos grasos. Estos cambios permiten mantener las características biofísicas y las funciones bioquímicas de las membranas frente a las fluctuaciones ambientales (Denich et al., 2003). En la bicapas lipídicas, las cadenas de ácidos grasos pueden encontrarse en forma ordenada y rígida o bien en forma relativamente desordenada, es decir, en estado fluido. La transición de estado rígido a estado fluido se presenta bruscamente cuando la temperatura supera la temperatura de fusión. Esta temperatura de transición depende de la longitud de las cadenas de ácidos grasos de su grado de insaturación. A mayor longitud de las cadenas, más rígida es la membrana ya que las cadenas hidrocarbonadas largas interaccionan mutuamente con más fuerza que las cortas (Denich et al., 2003). En este trabajo hemos demostrado que YycF juega un papel en la modulación de la composición de ácidos grasos en la membrana, de forma que su hiperproducción provoca un incremento en la longitud de los ácidos grasos, lo que presumiblemente contribuye a un incremento en la temperatura de transición de los fosfolípidos de membrana (Denich et al., 2003), un incremento en la rigidez de la membrana y un descenso de la permeabilidad (Aricha et al., 2004). Estudios transcriptómicos en *B. subtilis* también sugieren que este SDC YycFG participa en la regulación del metabolismo de ácidos grasos. La delección del SDC YycFG en *B. subtilis* provoca un incremento en la expresión de la desaturasa de fosfolípidos de membrana codificada por el gen *des* (Bisicchia et al., 2007).

Nuestros resultados transcriptómicos sugirieron que el conjunto de enzimas implicadas en la BAG formaban tres unidades transcripcionales distintas, *fabM*, *fabTH-acpP* y *fabKDGF-accB-fabZ-accCDA* (Mohedano et al., 2005), habiendo sido esta hipótesis posteriormente corroborada por Lu y cols. (2006). La primera unidad

transcripcional codifica la proteína FabM, que es una enoil-ACP isomerasa implicada en la síntesis de ácidos grasos insaturados y cuya regulación es independiente de las otras dos unidades transcripcionales (Marrakchi et al., 2002; Altabe et al., 2007). Esta unidad transcripcional no se encuentra afectada por la inducción de YycF tanto en presencia como en ausencia de YycG. Las otras dos unidades transcripcionales están coordinadamente reguladas de forma que, cuando se hiperexpresó YycF en presencia o ausencia del gen cromosómico *yycG*, la unidad transcripcional *fabTH-accP*, implicada en la iniciación y regulación de la BAG, se encontraba reprimida y los niveles de expresión de la unidad transcripcional *fabKDGF-accB-fabZ-accCDA*, implicada en la elongación de la BAG, aparecieron incrementados (Figs. 31B y 38B y Tablas 9, S2 y S3). Los análisis proteómicos de las estirpes hiperexpresoras del gen *yycF*, en presencia o en ausencia del gen cromosomal *yycG*, mostraron un incremento en el nivel de expresión de siete proteínas (FabK, FabD, FabG, FabF, AccA, AccB y AccC) implicadas en la BAG (Fig. 55) con respecto a la estirpe control portadora del plásmido pLS1RGFP (Figs. 34 y 38A). Estos resultados nos indicaron que el incremento de YycF podría provocar una alteración de la composición de ácidos grasos de la membrana de *S. pneumoniae*, no produciéndose un incremento en la cantidad total de ácidos grasos sino un incremento en la longitud de los mismos. Esta hipótesis ha sido demostrada en este trabajo tanto por el análisis de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases-espectrometría de masas (Tabla 8) como por cromatografía en capa fina (Fig. 40). En el caso de la estirpe JNR7/87[pRRHK], al no alterarse la BAG, ni a nivel transcriptómico ni a nivel proteómico, la composición de ácidos grasos de membrana era similar a la de la estirpe control (Fig. 40). Estos resultados indicaron que es la forma no fosforilada de YycF la responsable de la regulación de la BAG.

El segundo gen de este grupo de enzimas BAG (*fabT*) codifica el represor transcripcional FabT perteneciente a la familia de reguladores cuyo prototipo es MarR. Nosotros propusimos previamente, que YycF controlaría la BAG reprimiendo la expresión de FabT, que se uniría a una repetición inversa superpuesta al promotor de *fabKDGF-accB-fabZ-accCDA* reprimiendo la transcripción del operón (Mohedano et al., 2005). Posteriormente Lu y Rock (2006) mostraron que FabT realmente inhibe la transcripción de los genes que codifican todas las enzimas de la BAG excepto *fabM* (Lu y Rock, 2006). La inactivación de este regulador transcripcional en *S. pneumoniae* conduce, en la membrana, a un marcado aumento en la proporción de los ácidos grasos de 18 carbonos con respecto a los de 16 carbonos, en particular, el estearato (Lu y Rock,

2006). Estos cambios de composición de membrana presumiblemente producen un aumento de su rigidez y a un descenso de la permeabilidad, cambios similares a los provocados por la hiperproducción de YycF en ausencia o presencia del gen cromosómico *yycG*.



**Figura 55. Biosíntesis de ácidos grasos en *S. pneumoniae*.** (A) Representación de la ruta biosintética de los ácidos grasos saturados e insaturados en *S. pneumoniae*. (B) Operón de los genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos. Se han representado los posibles promotores y las regiones a las que se une el represor transcripcional FabT.

Los reguladores YycF de *B. subtilis* y *S. aureus* se unen a dos repeticiones directas formadas por dos hexanucleótidos separados por cinco nucleótidos, siendo la secuencia consenso propuesta para dicha unión 5'-TGTWAH-N5-TGTWAH-3' (Fukuchi et al., 2000; Dubrac y Msadek, 2004). Así, al desconocerse los operadores del YycF neumocócico, propusimos que el YycF no fosforilado reprimiría la expresión de la unidad transcripcional *fabTH-acpP* por unión a la secuencia 5'-TGTTTT-N3-TGTAAG-3' localizada entre la región -10 del promotor del operón y el codón ATG de inicio de la traducción del FabT (Mohedano et al., 2005).

Posteriormente, Ng y cols. (2005) detectaron la unión de la forma no fosforilada de YycF a la región promotora de FabT, pero al no detectar interacción de la forma fosforilada con el DNA, los autores propusieron que la unión del regulador era inespecífica. Sin embargo, nosotros hemos detectado una unión específica de YycF no fosforilado al promotor de FabT (Fig. 47), lo que nos indicó que YycF controlaba la expresión del regulador de la BAG. Así, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los estudios de interacción proteína-DNA, y al hecho de que nuestra proteína YycF purificada se encuentre en forma monomérica, proponemos que YycF, como monómero, se uniría a una sola secuencia 5'-TGTAAG-3' situada entre la región -10 y el sitio de inicio de la traducción de FabT (Fig. 56 y Fig. 31A). Finalmente, nuestros resultados obtenidos en ensayos de transcripción *in vitro* (Fig. 48) han mostrado que YycF es un represor de la transcripción desde el promotor  $P_{FabT}$ , validando una regulación de la BAG por inhibición de la síntesis de FabT.

## 6. Posible modelo de regulación de YycF en las distintas dianas

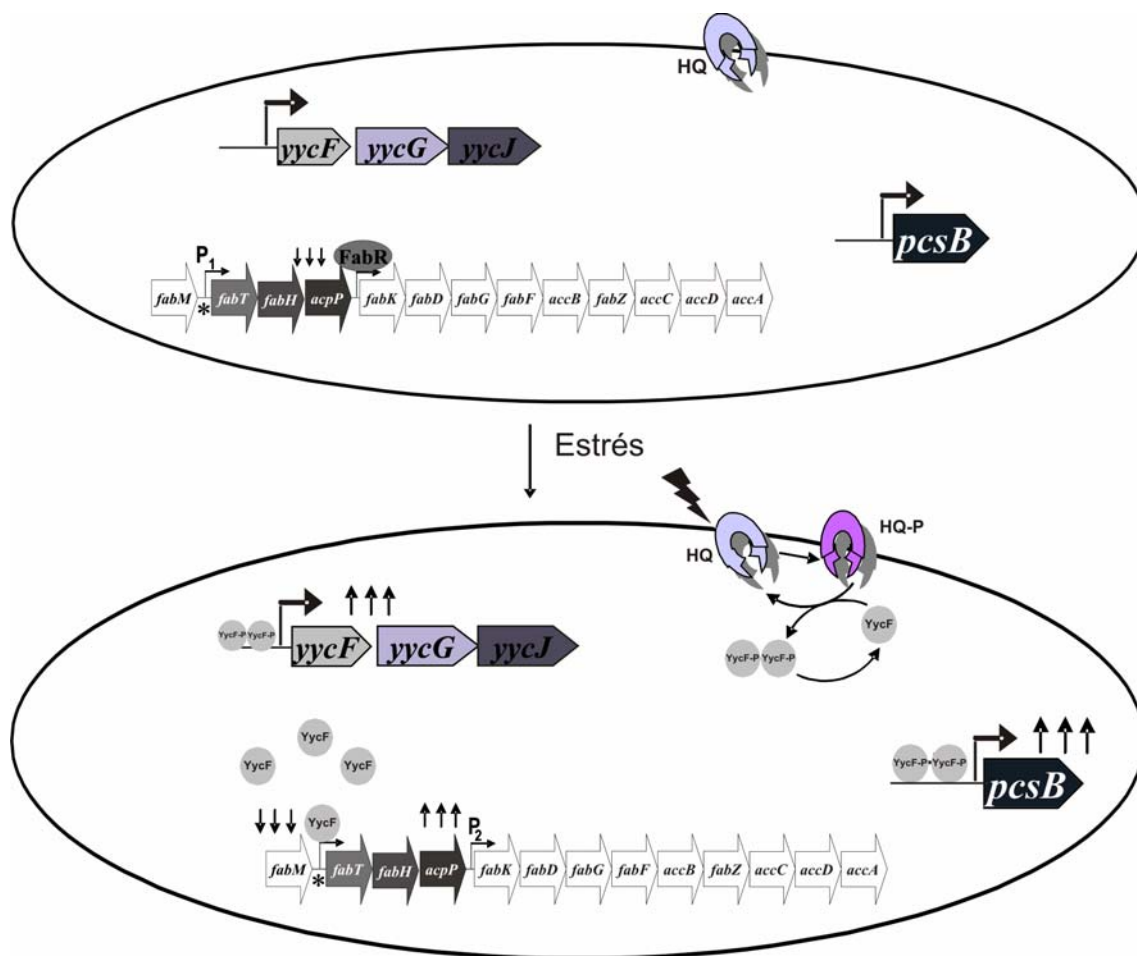
Nuestros resultados indican una función dual de YycF en *S. pneumoniae*, controlando el metabolismo de la pared celular, en su forma fosforilada, y la biogénesis de membrana en su forma no fosforilada.

El efector de la activación del SDC YycFG en *S. pneumoniae* es aún desconocido. Sin embargo, la histidina quinasa YycG es la única proteína que contiene dominio PAS (Fig. 6) en el neumococo. Este dominio está implicado en sensor señales tales como oxígeno, luz o potencial redox (Taylor y Zhulin, 1999) y, en el caso de *S. pneumoniae*, es requerido para la represión de la competencia en condiciones microaerobias (Echenique y Trombe, 2001). Si además tenemos en cuenta que la proteína YycG, en *S. pneumoniae*, carece de dominio extracelular, el estímulo sensor tendría que ser intracelular. Así, bajo unas determinadas y desconocidas condiciones de estrés intracelular, la proteína YycG sensoría el estímulo utilizando su dominio PAS.

Como consecuencia YycG catalizaría su autofosforilación, transfiriendo posteriormente el grupo fosfato al YycF, que induciría la transcripción del operón del SDC (Fig. 56). Además, ya que *yycF* es el primer gen del operón, la activación transcripcional debería conllevar a un incremento transitorio de YycF en su forma no fosforilada. Esta forma del regulador sería un controlador utilizado primordialmente en

determinadas condiciones de estrés para regular la expresión de FabT, que sería el controlador principal de la BAG. La represión mediada por YycF no fosforilado necesariamente debería ser transitoria, ya que las bacterias no podrían sobrevivir a una inhibición continuada de la iniciación de la BAG. Apoyando esta hipótesis, hemos comprobado que en ausencia de YycG las células son incapaces de crecer en condiciones de inducción continuada de YycF. Esta regulación transitoria de YycF no fosforilado finalizaría cuando la histidina quinasa YycG de nueva síntesis fuera anclada a la membrana, estimulándose, autofosforilandose y transfiriendo posteriormente el grupo fosfato al regulador. Los elevados niveles de YycF fosforilado controlarían la expresión de los genes implicados en el metabolismo de la pared celular y que son parte del regulón del SDC (*pcsB*, *lytB*, Sp0107, Sp2063) (Fig. 56). El incremento de la expresión de estos genes, además de alterar la división celular generando la formación de cadenas, podría generar una degradación de la pared celular que conllevaría a la lisis celular. Esta lisis celular provocaría una liberación de DNA, que podría estar implicado en el desarrollo de biofilms, forma natural de crecimiento y colonización de *S. pneumoniae* (Trappetti et al., 2009). Además en *Pseudomonas aeruginosa*, el DNA extracelular es el mayor componente estructural necesaria para el establecimiento y desarrollo de los biofilms bacterianos (Whitchurch et al., 2002), proponiéndose este efecto para todas bacterias capaces de liberar DNA entre las que se encuentra *S. pneumoniae* (Moscoso et al., 2006). Finalmente, la regulación transitoria mediada por la forma no fosforilada de YycF también podría estar implicada en el desarrollo de biofilms. El regulador no fosforilado provocaría una disminución de los niveles de FabT, que provocaría subsecuentemente un incremento de los niveles de las enzimas implicadas en la elongación de la BAG y como consecuencia final, una alteración de la composición de membrana, produciéndose un incremento en la longitud de los ácidos grasos (Mohedano et al., 2005; Lu y Rock, 2006) (Fig. 56). El aumento de la longitud de los ácidos grasos podría conllevar a un descenso en la permeabilidad de membrana, protegiendo así a las bacterias que componen el biofilm de los ataques del sistema inmune del hospedador (Stewart y Franklin, 2008).





**Figura 56. Posible modelo de regulación de YycF en las distintas dianas.** Los distintos mecanismos de regulación de YycF en las distintas dianas se encuentran explicados en el apartado 6 de la Discusión.



## **CONCLUSIONES**



Del estudio realizado en esta Tesis, podemos extraer las siguientes conclusiones:

1.-Se ha caracterizado la respuesta transcriptómica global de *S. pneumoniae* JNR7/87 serotipo 4 a la utilización de sacarosa o maltosa. Se han identificado miembros putativos del regulón del represor MalR, que codifican proteínas potencialmente implicadas en el transporte y metabolismo de maltosacáridos.

2.- Se ha validado la utilización de pLS1RGFP para sobreexpresar de forma controlada genes esenciales y los SDC de *S. pneumoniae* (Mohedano et al. 2005). Como consecuencia de nuestros resultados, el sistema de sobreexpresión ha sido posteriormente utilizado para identificar y estudiar los regulones de otros SDC de *S. pneumoniae*, como el RR/HQ06 (Standish et al., 2007) y el gen esencial *pcsB* (Barendt et al. 2009).

3.-El regulador YycF ha sido sobreproducido como una proteína recombinante (His<sub>6</sub>-YycF) en *E. coli* y purificado tanto a partir de su forma soluble como a partir de los cuerpos de inclusión con varias estrategias. Los resultados obtenidos revelan que YycF requiere la presencia de 0.5 M de NaCl para mantenerse en forma soluble hasta una concentración de 30  $\mu$ M. Este requerimiento ha sido observado tanto para la proteína producida en forma soluble como para la solubilizada por desplegamiento y repliegamiento. Análisis de YycF por ultracentrifugación analítica han revelado que es un monómero de forma globular y soluble.

4.- La proteína YycF ha sido fosforilada químicamente con acetil fosfato. Los análisis de la proteína fosforilada por HPLC, MALDI-TOF y ultracentrifugación analítica han revelado que la forma de YycF fosforilada contiene 2 grupos fosfatos y que es insoluble incluso en condiciones de fuerza iónica elevada.

5.- Nuestros análisis del mRNA del SDC YycFG por extensión del cebador, microarray y RT-PCR confirman que en la estirpe JNR7/87 existe una cotranscripción de los genes *yycF* e *yycG*, al igual que ocurre en la estirpe no capsuladas R6 de *S. pneumoniae*. Sin embargo, no apoyan que *vicX* esté incluido en el mRNA del SDC como se ha propuesto para la estirpe R6. Además, los análisis mencionados anteriormente, junto con los estudios de interacción de YycF con la región promotora

de YycFG han revelado que el regulador de respuesta controla su expresión y la de *yycG*.

6.-Nuestros análisis transcriptómicos de estirpes mutantes para el SDC YycFG y los de otros autores han mostrado un control de YycF sobre los procesos de división celular, así como de la biogénesis y la degradación de la pared celular. Además, indican que la forma YycF-P del regulador es responsable de esta regulación.

7.- Nuestros análisis transcriptómicos y proteómicos utilizando estirpes mutantes para el SDC YycFG han mostrado, que la sobreproducción de YycF en bacterias silvestres o carentes de YycG provoca una alteración de los niveles de expresión de todos los genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos, a excepción de la desaturasa FabM. Este efecto no se produce al sobreexpresar conjuntamente YycF e YycG, sugiriendo que la forma no fosforilada de YycF es responsable de la regulación de la biogénesis de la membrana.

9. Nuestros estudios de interacción de YycF-DNA y de transcripción *in vitro* han revelado que YycF regula la biosíntesis de ácidos grasos por inhibición de la transcripción de FabT, que es el represor de la expresión de los genes implicados en la iniciación y elongación de los ácidos grasos. Además, confirman que YycF sin fosforilar, al menos *in vitro*, es capaz de regular la expresión de FabT

10. Análisis de la composición de los ácidos grasos de la membrana de las estirpes de *S. pneumoniae* silvestre y mutantes para el SDC han revelado que el incremento de los niveles de YycF provocan un incremento de la longitud de los ácidos grasos, que debe provocar un incremento de la rigidez de la membrana y en consecuencia una disminución de su permeabilidad.

11. Finalmente, nuestros resultados indican que en el sistema SDC YycFG, tanto YycF-P como YycF son reguladores, que controlan procesos distintos y esenciales para la bacteria.

12. La esencialidad del SDC YycFG en bacterias patógenas gram positivas lo convierte en una diana potencial para la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos.

Los mutantes de este SDC contruidos en este trabajo pueden servir para evaluar *in vivo* compuestos antibacterianos.





## **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

- Acebo P, Nieto C, Corrales MA, Espinosa M, Lopez P. 2000. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* cells harbouring single or multiple copies of the gene encoding the green fluorescent protein. *Microbiology (Reading, England)* 146 ( Pt 6):1267-1273.
- Aguilar PS, Cronan JE, Jr., de Mendoza D. 1998. A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *Journal of bacteriology* 180:2194-2200.
- Aguilar PS, Hernandez-Arriaga AM, Cybulski LE, Erazo AC, de Mendoza D. 2001. Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *The EMBO journal* 20:1681-1691.
- Ahn SJ, Burne RA. 2007. Effects of oxygen on biofilm formation and the AtlA autolysin of *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology* 189:6293-6302.
- Ahn SJ, Wen ZT, Burne RA. 2007. Effects of oxygen on virulence traits of *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology* 189:8519-8527.
- Altabe S, Lopez P, de Mendoza D. 2007. Isolation and Characterization of Unsaturated Fatty Acid Auxotrophs of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology*.
- Altabe SG, Aguilar P, Caballero GM, de Mendoza D. 2003. The *Bacillus subtilis* acyl lipid desaturase is a delta5 desaturase. *Journal of bacteriology* 185:3228-3231.
- Apfel CM, Takacs B, Fountoulakis M, Stieger M, Keck W. 1999. Use of genomics to identify bacterial undecaprenyl pyrophosphate synthetase: cloning, expression, and characterization of the essential *uppS* gene. *Journal of bacteriology* 181:483-492.
- Appelbaum PC. 2002. Resistance among *Streptococcus pneumoniae*: Implications for drug selection. *Clin Infect Dis* 34:1613-1620.
- Appelbaum PC, Bozdogan B. 2004. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clinics in laboratory medicine* 24:381-402.
- Arcus VL, Lott JS, Johnston JM, Baker EN. 2006. The potential impact of structural genomics on tuberculosis drug discovery. *Drug discovery today* 11:28-34.
- Aricha B, Fishov I, Cohen Z, Sikron N, Pesakhov S, Khozin-Goldberg I, Dagan R, Porat N. 2004. Differences in membrane fluidity and fatty acid composition between phenotypic variants of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology* 186:4638-4644.
- Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. 1995. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. 1944. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 1:344-365.
- Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. 2006. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat* 9:142-156.
- Bachhawat P, Swapna GV, Montelione GT, Stock AM. 2005. Mechanism of activation for transcription factor PhoB suggested by different modes of dimerization in the inactive and active states. *Structure* 13:1353-1363.
- Barza M. 1993. Anatomical barriers for antimicrobial agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12 Suppl 1:S31-35.
- Bent CJ, Isaacs NW, Mitchell TJ, Riboldi-Tunnicliffe A. 2004. Crystal structure of the response regulator 02 receiver domain, the essential YycF two-component

- system of *Streptococcus pneumoniae* in both complexed and native states. *Journal of bacteriology* 186:2872-2879.
- Bentley DW. 1981. Pneumococcal vaccine in the institutionalized elderly: review of past and recent studies. *Reviews of infectious diseases* 3 Suppl:S61-70.
- Bilwes AM, Alex LA, Crane BR, Simon MI. 1999. Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* 96:131-141.
- Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7:1513-1523.
- Bisicchia P, Noone D, Lioliou E, Howell A, Quigley S, Jensen T, Jarmer H, Devine KM. 2007. The essential YycFG two-component system controls cell wall metabolism in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* 65:180-200.
- Blanco AG, Sola M, Gomis-Ruth FX, Coll M. 2002. Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator. *Structure* 10:701-713.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911-917.
- Blue CE, Mitchell TJ. 2003. Contribution of a response regulator to the virulence of *Streptococcus pneumoniae* is strain dependent. *Infection and immunity* 71:4405-4413.
- Bricker AL, Camilli A. 1999. Transformation of a type 4 encapsulated strain of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS microbiology letters* 172:131-135.
- Brickner SJ, Barbachyn MR, Hutchinson DK, Manninen PR. 2008. Linezolid (ZYVOX), the first member of a completely new class of antibacterial agents for treatment of serious gram-positive infections. *Journal of medicinal chemistry* 51:1981-1990.
- Brocker M, Bott M. 2006. Evidence for activator and repressor functions of the response regulator MtrA from *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS microbiology letters* 264:205-212.
- Brown JL, North S, Bussey H. 1993. SKN7, a yeast multicopy suppressor of a mutation affecting cell wall beta-glucan assembly, encodes a product with domains homologous to prokaryotic two-component regulators and to heat shock transcription factors. *Journal of bacteriology* 175:6908-6915.
- Brown JS, Gilliland SM, Holden DW. 2001. A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. *Molecular microbiology* 40:572-585.
- Brown JS, Holden DW. 2002. Iron acquisition by Gram-positive bacterial pathogens. *Microbes Infect* 4:1149-1156.
- Bryan EM, Bae T, Kleerebezem M, Dunny GM. 2000. Improved vectors for nisin-controlled expression in gram-positive bacteria. *Plasmid* 44:183-190.
- Buist G, Steen A, Kok J, Kuipers OP. 2008. LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Molecular microbiology* 68:838-847.
- Burdett V. 1980. Identification of tetracycline-resistant R-plasmids in *Streptococcus agalactiae* (group B). *Antimicrobial agents and chemotherapy* 18:753-760.
- Burgess RR. 1991. Use of Polyethyleneimine in Purification of DNA-Binding Proteins. *Methods in Enzymology* 208:3-10.
- Campbell JW, Cronan JE, Jr. 2001. *Escherichia coli* FadR positively regulates transcription of the *fabB* fatty acid biosynthetic gene. *Journal of bacteriology* 183:5982-5990.
- Cangelosi GA, Do JS, Freeman R, Bennett JG, Semret M, Behr MA. 2006. The two-component regulatory system *mtrAB* is required for morphotypic multidrug

- resistance in *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50:461-468.
- Clark DP, DeMendoza D, Polacco ML, Cronan JE, Jr. 1983. Beta-hydroxydecanoyl thio ester dehydrase does not catalyze a rate-limiting step in *Escherichia coli* unsaturated fatty acid synthesis. *Biochemistry* 22:5897-5902.
- Claverys JP, Prudhomme M, Martin B. 2006. Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annual review of microbiology* 60:451-475.
- Cleveland WS, Devlin SJ. 1988. Locally Weighted Regression: An Approach to Regression Analysis by Local Fitting *Journal of the American Statistical Association* 83:596-610.
- Coates AR, Hu Y. 2006. New strategies for antibacterial drug design: targeting non-multiplying latent bacteria. *Drugs in R&D* 7:133-151.
- Cole JL. 2004. Analysis of heterogeneous interactions. *Methods in Enzymology* 384:212-232.
- Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173:33-38.
- Cronan JE, Jr. 1997. In vivo evidence that acyl coenzyme A regulates DNA binding by the *Escherichia coli* FadR global transcription factor. *Journal of bacteriology* 179:1819-1823.
- Cronan JE, Jr., Subrahmanyam S. 1998. FadR, transcriptional co-ordination of metabolic expediency. *Molecular microbiology* 29:937-943.
- Cronan JE, Jr., Waldrop GL. 2002. Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. *Progress in lipid research* 41:407-435.
- Crook DW, Spratt BG. 1998. Multiple antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *British medical bulletin* 54:595-610.
- Cybulski LE, Albanesi D, Mansilla MC, Altabe S, Aguilar PS, de Mendoza D. 2002. Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the *Bacillus subtilis* acyl-lipid desaturase. *Molecular microbiology* 45:1379-1388.
- Cybulski LE, del Solar G, Craig PO, Espinosa M, de Mendoza D. 2004. *Bacillus subtilis* DesR functions as a phosphorylation-activated switch to control membrane lipid fluidity. *The Journal of biological chemistry* 279:39340-39347.
- Chalmers R, Sewitz S, Lipkow K, Crellin P. 2000. Complete nucleotide sequence of Tn10. *Journal of bacteriology* 182:2970-2972.
- Champoux JJ. 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual review of biochemistry* 70:369-413.
- Chan PF, O'Dwyer KM, Palmer LM, Ambrad JD, Ingraham KA, So C, Lonetto MA, Biswas S, Rosenberg M, Holmes DJ, Zalacain M. 2003. Characterization of a novel fucose-regulated promoter (P<sub>fcsK</sub>) suitable for gene essentiality and antibacterial mode-of-action studies in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology* 185:2051-2058.
- Cheng X, Patterson TA. 1992. Construction and use of lambda PL promoter vectors for direct cloning and high level expression of PCR amplified DNA coding sequences. *Nucleic acids research* 20:4591-4598.
- Choi KH, Heath RJ, Rock CO. 2000. beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) is a determining factor in branched-chain fatty acid biosynthesis. *Journal of bacteriology* 182:365-370.
- Dagan R, Melamed R, Muallem M, Piglansky L, Greenberg D, Abramson O, Mendelman PM, Bohidar N, Yagupsky P. 1996. Reduction of nasopharyngeal carriage of pneumococci during the second year of life by a heptavalent

- conjugate pneumococcal vaccine. *The Journal of infectious diseases* 174:1271-1278.
- Davies J. 1996. Bacteria on the rampage. *Nature* 383:219-220.
- Davis MS, Cronan JE, Jr. 2001. Inhibition of Escherichia coli acetyl coenzyme A carboxylase by acyl-acyl carrier protein. *Journal of bacteriology* 183:1499-1503.
- de la Torre JC, Ortin J, Domingo E, Delamarter J, Allet B, Davies J, Bertrand KP, Wray LV, Jr., Reznikoff WS. 1984. Plasmid vectors based on Tn10 DNA: gene expression regulated by tetracycline. *Plasmid* 12:103-110.
- De Las Rivas B, Garcia JL, Lopez R, Garcia P. 2002. Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo-beta-N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *Journal of bacteriology* 184:4988-5000.
- De Ruyter PG, Kuipers OP, Beerthuyzen MM, van Alen-Boerrigter I, de Vos WM. 1996. Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of Lactococcus lactis. *Journal of bacteriology* 178:3434-3439.
- Denich TJ, Beaudette LA, Lee H, Trevors JT. 2003. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of microbiological methods* 52:149-182.
- Deutscher J, Francke C, Postma PW. 2006. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:939-1031.
- DiRusso CC, Tsvetnitsky V, Hojrup P, Knudsen J. 1998. Fatty acyl-CoA binding domain of the transcription factor FadR. Characterization by deletion, affinity labeling, and isothermal titration calorimetry. *The Journal of biological chemistry* 273:33652-33659.
- Dopazo J, Mendoza A, Herrero J, Caldara F, Humbert Y, Friedli L, Guerrier M, Grand-Schenk E, Gandin C, de Francesco M, Polissi A, Buell G, Feger G, Garcia E, Peitsch M, García-Bustos JF. 2001. Annotated draft genomic sequence from a Streptococcus pneumoniae type 19F clinical isolate. *Microbial drug resistance (Larchmont, NY)* 7:99-125.
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. 1988. High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic acids research* 16:6127-6145.
- Dubrac S, Boneca IG, Poupel O, Msadek T. 2007. New insights into the WalK/WalR (YycG/YycF) essential signal transduction pathway reveal a major role in controlling cell wall metabolism and biofilm formation in Staphylococcus aureus. *Journal of bacteriology*.
- Dubrac S, Msadek T. 2004. Identification of genes controlled by the essential YycG/YycF two-component system of Staphylococcus aureus. *Journal of bacteriology* 186:1175-1181.
- Dutta R, Inouye M. 2000. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends in biochemical sciences* 25:24-28.
- Echenique JR, Trombe MC. 2001. Competence repression under oxygen limitation through the two-component MicAB signal-transducing system in Streptococcus pneumoniae and involvement of the PAS domain of MicB. *Journal of bacteriology* 183:4599-4608.
- Eichenbaum Z, Federle MJ, Marra D, de Vos WM, Kuipers OP, Kleerebezem M, Scott JR. 1998. Use of the lactococcal nisA promoter to regulate gene expression in gram-positive bacteria: comparison of induction level and promoter strength. *Applied and environmental microbiology* 64:2763-2769.
- Elsinghorst EA, Mortlock RP. 1994. Molecular cloning of the Escherichia coli B L-fucose-D-arabinose gene cluster. *Journal of bacteriology* 176:7223-7232.

- Engelke G, Gutowski-Eckel Z, Kiesau P, Siegers K, Hammelmann M, Entian KD. 1994. Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. *Applied and environmental microbiology* 60:814-825.
- Ermolaeva MD, White O, Salzberg SL. 2001. Prediction of operons in microbial genomes. *Nucleic acids research* 29:1216-1221.
- Eskola J, Kilpi T, Palmu A, Jokinen J, Haapakoski J, Herva E, Takala A, Kayhty H, Karma P, Kohberger R, Siber G, Makela PH. 2001. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *The New England journal of medicine* 344:403-409.
- Fabret C, Hoch JA. 1998. A two-component signal transduction system essential for growth of *Bacillus subtilis*: implications for anti-infective therapy. *Journal of bacteriology* 180:6375-6383.
- Faden H, Stanievich J, Brodsky L, Bernstein J, Ogra PL. 1990. Changes in nasopharyngeal flora during otitis media of childhood. *The Pediatric infectious disease journal* 9:623-626.
- Farias ME, Espinosa M. 2000. Conjugal transfer of plasmid pMV158: uncoupling of the pMV158 origin of transfer from the mobilization gene mobM, and modulation of pMV158 transfer in *Escherichia coli* mediated by IncP plasmids. *Microbiology (Reading, England)* 146 ( Pt 9):2259-2265.
- Fattom AI, Horwith G, Fuller S, Propst M, Naso R. 2004. Development of StaphVAX, a polysaccharide conjugate vaccine against *S. aureus* infection: from the lab bench to phase III clinical trials. *Vaccine* 22:880-887.
- Fernández de Palencia P, de la Plaza M, Mohedano ML, Martínez-Cuesta MC, Requena T, López P, Peláez C. 2004. Enhancement of 2-methylbutanal formation in cheese by using a fluorescently tagged Lacticin 3147 producing *Lactococcus lactis* strain. *International journal of food microbiology* 93:335-347.
- Fernández de Palencia P, Nieto C, Acebo P, Espinosa M, López P. 2000. Expression of green fluorescent protein in *Lactococcus lactis*. *FEMS microbiology letters* 183:229-234.
- Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM, et al. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science (New York, NY)* 269:496-512.
- Freiberg C, Brotz-Oesterhelt H. 2005. Functional genomics in antibacterial drug discovery. *Drug discovery today* 10:927-935.
- Fukuchi K, Kasahara Y, Asai K, Kobayashi K, Moriya S, Ogasawara N. 2000. The essential two-component regulatory system encoded by *yycF* and *yycG* modulates expression of the *ftsAZ* operon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology (Reading, England)* 146 ( Pt 7):1573-1583.
- Fukushima T, Szurmant H, Kim EJ, Perego M, Hoch JA. 2008. A sensor histidine kinase co-ordinates cell wall architecture with cell division in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* 69:621-632.
- Galperin MY, Nikolskaya AN, Koonin EV. 2001. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS microbiology letters* 203:11-21.
- Gao R, Mack TR, Stock AM. 2007. Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends in biochemical sciences* 32:225-234.
- García-Quintans N, Magni C, de Mendoza D, López P. 1998. The citrate transport system of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* is induced by acid stress. *Applied and environmental microbiology* 64:850-857.

- Gasson MJ. 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *Journal of bacteriology* 154:1-9.
- Geissendorfer M, Hillen W. 1990. Regulated expression of heterologous genes in *Bacillus subtilis* using the Tn10 encoded tet regulatory elements. *Applied microbiology and biotechnology* 33:657-663.
- Giard JC, Rince A, Capioux H, Auffray Y, Hartke A. 2000. Inactivation of the stress- and starvation-inducible *gls24* operon has a pleiotrophic effect on cell morphology, stress sensitivity, and gene expression in *Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology* 182:4512-4520.
- Gibello A, Collins MD, Dominguez L, Fernández-Garayzabal JF, Richardson PT. 1999. Cloning and analysis of the L-lactate utilization genes from *Streptococcus iniae*. *Applied and environmental microbiology* 65:4346-4350.
- Giebink GS. 2001. The prevention of pneumococcal disease in children. *The New England journal of medicine* 345:1177-1183.
- Giefing C, Meinke AL, Hanner M, Henics T, Bui MD, Gelbmann D, Lundberg U, Senn BM, Schunn M, Habel A, Henriques-Normark B, Ortqvist A, Kalin M, von Gabain A, Nagy E. 2008. Discovery of a novel class of highly conserved vaccine antigens using genomic scale antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies. *The Journal of experimental medicine* 205:117-131.
- Gosink KK, Mann ER, Guglielmo C, Tuomanen EI, Masure HR. 2000. Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity* 68:5690-5695.
- Grebe TW, Stock JB. 1999. The histidine protein kinase superfamily. *Advances in microbial physiology* 41:139-227.
- Greenwood B. 1999. The epidemiology of pneumococcal infection in children in the developing world. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 354:777-785.
- Grkovic S, Brown MH, Skurray RA. 2002. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:671-701, table of contents.
- Groisman EA, Mouslim C. 2006. Sensing by bacterial regulatory systems in host and non-host environments. *Nature reviews* 4:705-709.
- Gromadski KB, Rodnina MV. 2004. Streptomycin interferes with conformational coupling between codon recognition and GTPase activation on the ribosome. *Nature structural & molecular biology* 11:316-322.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* 166:557-580.
- Hancock LE, Perego M. 2004. Systematic inactivation and phenotypic characterization of two-component signal transduction systems of *Enterococcus faecalis* V583. *Journal of bacteriology* 186:7951-7958.
- Hancock REW. 2007. The end of an era? *Nat Rev Drug Discov* 6.
- Havarstein LS, Coomaraswamy G, Morrison DA. 1995. An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:11140-11144.
- Hayhurst EJ, Kailas L, Hobbs JK, Foster SJ. 2008. Cell wall peptidoglycan architecture in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:14603-14608.



- Heath RJ, Rock CO. 1996a. Inhibition of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) by acyl-acyl carrier protein in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 271:10996-11000.
- Heath RJ, Rock CO. 1996b. Regulation of fatty acid elongation and initiation by acyl-acyl carrier protein in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 271:1833-1836.
- Heath RJ, White SW, Rock CO. 2001. Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. *Progress in lipid research* 40:467-497.
- Heim R, Cubitt AB, Tsien RY. 1995. Improved green fluorescence. *Nature* 373:663-664.
- Henrichsen J. 1995. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of clinical microbiology* 33:2759-2762.
- Hillen W, Berens C. 1994. Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annual review of microbiology* 48:345-369.
- Hinds J, Witney AA, Vass JK. 2002. Microarray design for bacterial genomes. In: Dorrell IBWaN, ed. *Methods in microbiology: functional microbial genomics*. London, United Kingdom: Academic Press. pp 67-82.
- Hjuler T, Wohlfahrt J, Simonsen J, Kaltoft MS, Koch A, Kamper-Jorgensen M, Biggar RJ, Melbye M. 2007. Perinatal and crowding-related risk factors for invasive pneumococcal disease in infants and young children: a population-based case-control study. *Clin Infect Dis* 44:1051-1056.
- Hoch JA. 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Current opinion in microbiology* 3:165-170.
- Hoch JA, Varughese KI. 2001. Keeping signals straight in phosphorelay signal transduction. *Journal of bacteriology* 183:4941-4949.
- Holt J, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JTA, Williams ST. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hosea SW, Brown EJ, Hamburger MI, Frank MM. 1981. Opsonic requirements for intravascular clearance after splenectomy. *The New England journal of medicine* 304:245-250.
- Hoskins J, Alborn WE, Jr., Arnold J, Blaszcak LC, Burgett S, DeHoff BS, Estrem ST, Fritz L, Fu DJ, Fuller W, Geringer C, Gilmour R, Glass JS, Khoja H, Kraft AR, Lagace RE, LeBlanc DJ, Lee LN, Lefkowitz EJ, Lu J, Matsushima P, McAhren SM, McHenney M, McLeaster K, Mundy CW, Nicas TI, Norris FH, O'Gara M, Peery RB, Robertson GT, Rockey P, Sun PM, Winkler ME, Yang Y, Young-Bellido M, Zhao G, Zook CA, Baltz RH, Jaskunas SR, Rosteck PR, Jr., Skatrud PL, Glass JI. 2001. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *Journal of bacteriology* 183:5709-5717.
- Hoskisson PA, Hutchings MI. 2006. MtrAB-LpqB: a conserved three-component system in actinobacteria? *Trends in microbiology* 14:444-449.
- Howell A, Dubrac S, Andersen KK, Noone D, Fert J, Msadek T, Devine K. 2003. Genes controlled by the essential YycG/YycF two-component system of *Bacillus subtilis* revealed through a novel hybrid regulator approach. *Molecular microbiology* 49:1639-1655.
- Hrabak J. 2007. [Clinically important beta-lactamases of gram-negative bacteria: extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 56:103-111.
- Hua J, Chang C, Sun Q, Meyerowitz EM. 1995. Ethylene insensitivity conferred by *Arabidopsis* ERS gene. *Science (New York, NY)* 269:1712-1714.

- Huang WM. 1996. Bacterial diversity based on type II DNA topoisomerase genes. *Annual review of genetics* 30:79-107.
- Hueck CJ, Hillen W, Saier MH, Jr. 1994. Analysis of a cis-active sequence mediating catabolite repression in gram-positive bacteria. *Research in microbiology* 145:503-518.
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. 1990. *PCR protocols to methods and applications*. San Diego: Academic Press.
- Iyer R, Camilli A. 2007. Sucrose metabolism contributes to in vivo fitness of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular microbiology* 66:1-13.
- Jacob F, Monod J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of molecular biology* 3:318-356.
- Jacoby GA. 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* 41 Suppl 2:S120-126.
- James ES, Cronan JE. 2004. Expression of two *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase subunits is autoregulated. *The Journal of biological chemistry* 279:2520-2527.
- Jana S, Deb JK. 2006. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Applied microbiology and biotechnology* 70:140-150.
- Kadioglu A, Echenique J, Manco S, Trombe MC, Andrew PW. 2003. The MicAB two-component signaling system is involved in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity* 71:6676-6679.
- Karchmer AW. 2004. Increased antibiotic resistance in respiratory tract pathogens: PROTEKT US--an update. *Clin Infect Dis* 39 Suppl 3:S142-150.
- Kim S, Lee SW, Choi EC, Choi SY. 2003. Aminoacyl-tRNA synthetases and their inhibitors as a novel family of antibiotics. *Applied microbiology and biotechnology* 61:278-288.
- King-Scott J, Nowak E, Mylonas E, Panjikar S, Roessle M, Svergun DI, Tucker PA. 2007. The structure of a full-length response regulator from *Mycobacterium tuberculosis* in a stabilized three-dimensional domain-swapped, activated state. *The Journal of biological chemistry* 282:37717-37729.
- Kishii R, Falzon L, Yoshida T, Kobayashi H, Inouye M. 2007. Structural and functional studies of the HAMP domain of EnvZ, an osmosensing transmembrane histidine kinase in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 282:26401-26408.
- Kleerebezem M, Beerthuyzen MM, Vaughan EE, de Vos WM, Kuipers OP. 1997. Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp. *Applied and environmental microbiology* 63:4581-4584.
- Kobayashi K, Ogura M, Yamaguchi H, Yoshida K, Ogasawara N, Tanaka T, Fujita Y. 2001. Comprehensive DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* two-component regulatory systems. *Journal of bacteriology* 183:7365-7370.
- Kuipers OP, Beerthuyzen MM, de Ruyter PG, Luesink EJ, de Vos WM. 1995a. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *The Journal of biological chemistry* 270:27299-27304.
- Kuipers OP, de Ruyter PG, Kleerebezem M, de Vos WM. 1997. Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. *Trends in biotechnology* 15:135-140.
- Kuipers OP, Rollema HS, Siezen RJ, De Vos WM. 1995b. Lactococcal expression systems for protein engineering of nisin. *Developments in biological standardization* 85:605-613.
- Labischinski H. 2001. New antibiotics. *Int J Med Microbiol* 291:317-318.

- Lacks S. 1966. Integration efficiency and genetic recombination in pneumococcal transformation. *Genetics* 53:207-235.
- Lacks S. 1968. Genetic regulation of maltosaccharide utilization in *Pneumococcus*. *Genetics* 60:685-706.
- Lacks S. 1970. Mutants of *Diplococcus pneumoniae* that lack deoxyribonucleases and other activities possibly pertinent to genetic transformation. *Journal of bacteriology* 101:373-383.
- Lacks SA, Lopez P, Greenberg B, Espinosa M. 1986. Identification and analysis of genes for tetracycline resistance and replication functions in the broad-host-range plasmid pLS1. *Journal of molecular biology* 192:753-765.
- Lal R, Lal S. 1994. Recent trends in rifamycin research. *Bioessays* 16:211-216.
- Lambert PA. 2002. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *Journal of applied microbiology* 92 Suppl:46S-54S.
- Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. 2008. Polymyxins revisited. *Clinical microbiology reviews* 21:449-465.
- Lange R, Wagner C, de Saizieu A, Flint N, Molnos J, Stieger M, Caspers P, Kamber M, Keck W, Amrein KE. 1999. Domain organization and molecular characterization of 13 two-component systems identified by genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* 237:223-234.
- Langton KP, Henderson PJ, Herbert RB. 2005. Antibiotic resistance: multidrug efflux proteins, a common transport mechanism? *Natural product reports* 22:439-451.
- Lanie JA, Ng WL, Kazmierczak KM, Andrzejewski TM, Davidsen TM, Wayne KJ, Tettelin H, Glass JI, Winkler ME. 2007. Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *Journal of bacteriology* 189:38-51.
- Laue TM, Shah BD, Ridgeway TM, Pelletier SL. 1992. *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science*. Cambridge, UK: Society of Chemistry.
- Le Breton Y, Pichereau V, Sauvageot N, Auffray Y, Rince A. 2005. Maltose utilization in *Enterococcus faecalis*. *Journal of applied microbiology* 98:806-813.
- Le Gouill C, Parent JL, Rola-Pleszczynski M, Stankova J. 1994. Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Analytical biochemistry* 219:164.
- Lewis M, Chang G, Horton NC, Kercher MA, Pace HC, Schumacher MA, Brennan RG, Lu P. 1996. Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer. *Science (New York, NY)* 271:1247-1254.
- Li SJ, Cronan JE, Jr. 1993. Growth rate regulation of *Escherichia coli* acetyl coenzyme A carboxylase, which catalyzes the first committed step of lipid biosynthesis. *Journal of bacteriology* 175:332-340.
- Lin AH, Murray RW, Vidmar TJ, Marotti KR. 1997. The oxazolidinone eperzolid binds to the 50S ribosomal subunit and competes with binding of chloramphenicol and lincomycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 41:2127-2131.
- Liu M, Hanks TS, Zhang J, McClure MJ, Siemsen DW, Elser JL, Quinn MT, Lei B. 2006. Defects in ex vivo and in vivo growth and sensitivity to osmotic stress of group A *Streptococcus* caused by interruption of response regulator gene *vicR*. *Microbiology (Reading, England)* 152:967-978.
- Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. 2006. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 367:1747-1757.

- Lopez R, Gonzalez MP, Garcia E, Garcia JL, Garcia P. 2000. Biological roles of two new murein hydrolases of *Streptococcus pneumoniae* representing examples of module shuffling. *Research in microbiology* 151:437-443.
- Lovett PS. 1996. Translation attenuation regulation of chloramphenicol resistance in bacteria--a review. *Gene* 179:157-162.
- Lu H, Tonge PJ. 2008. Inhibitors of FabI, an enzyme drug target in the bacterial fatty acid biosynthesis pathway. *Accounts of chemical research* 41:11-20.
- Lu YJ, Rock CO. 2006. Transcriptional regulation of fatty acid biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular microbiology* 59:551-566.
- Lu YJ, Zhang YM, Rock CO. 2004. Product diversity and regulation of type II fatty acid synthases. *Biochem Cell Biol* 82:145-155.
- Lutz R, Bujard H. 1997. Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic acids research* 25:1203-1210.
- Mack T, Piscataway N. 2008. *Characterization of the inter- and intramolecular interactions that mediate the phosphorylation-dependent activation of the response regulator PhoB*.
- Macheboeuf P, Contreras-Martel C, Job V, Dideberg O, Dessen A. 2006. Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS microbiology reviews* 30:673-691.
- Mansilla MC, Cybulski LE, Albanesi D, de Mendoza D. 2004. Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *Journal of bacteriology* 186:6681-6688.
- Marina A, Mott C, Auyzenberg A, Hendrickson WA, Waldburger CD. 2001. Structural and mutational analysis of the PhoQ histidine kinase catalytic domain. Insight into the reaction mechanism. *The Journal of biological chemistry* 276:41182-41190.
- Marina A, Waldburger CD, Hendrickson WA. 2005. Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein. *The EMBO journal* 24:4247-4259.
- Marrakchi H, Choi KH, Rock CO. 2002. A new mechanism for anaerobic unsaturated fatty acid formation in *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of biological chemistry* 277:44809-44816.
- Marrakchi H, Dewolf WE, Jr., Quinn C, West J, Polizzi BJ, So CY, Holmes DJ, Reed SL, Heath RJ, Payne DJ, Rock CO, Wallis NG. 2003. Characterization of *Streptococcus pneumoniae* enoyl-(acyl-carrier protein) reductase (FabK). *Biochem J* 370:1055-1062.
- Martín PK, Li T, Sun D, Biek DP, Schmid MB. 1999. Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* 181:3666-3673.
- Mascher T, Helmann JD, Unden G. 2006. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:910-938.
- Matassova NB, Rodnina MV, Endermann R, Kroll HP, Pleiss U, Wild H, Wintermeyer W. 1999. Ribosomal RNA is the target for oxazolidinones, a novel class of translational inhibitors. *RNA (New York, NY)* 5:939-946.
- Maxam AM, Gilbert W, Lawrence Grossman and Kivie M. 1980. [57] Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods in Enzymology*: Academic Press. pp 499-560.
- McDevitt D, Rosenberg M. 2001. Exploiting genomics to discover new antibiotics. *Trends in microbiology* 9:611-617.

- McGee L. 2007. The coming of age of niche vaccines? Effect of vaccines on resistance profiles in *Streptococcus pneumoniae*. *Current opinion in microbiology* 10:473-478.
- Meier I, Wray LV, Hillen W. 1988. Differential regulation of the Tn10-encoded tetracycline resistance genes tetA and tetR by the tandem tet operators O1 and O2. *The EMBO journal* 7:567-572.
- Miller WG, Lindow SE. 1997. An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions. *Gene* 191:149-153.
- Mills MF, Marquart ME, McDaniel LS. 2007. Localization of PcsB of *Streptococcus pneumoniae* and its differential expression in response to stress. *Journal of bacteriology* 189:4544-4546.
- Mitscher LA. 2005. Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents. *Chemical reviews* 105:559-592.
- Mizuno T. 1997. Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res* 4:161-168.
- Mohan S, Kelly TM, Eveland SS, Raetz CR, Anderson MS. 1994. An *Escherichia coli* gene (FabZ) encoding (3R)-hydroxymyristoyl acyl carrier protein dehydrase. Relation to fabA and suppression of mutations in lipid A biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 269:32896-32903.
- Mohedano ML, Overweg K, de la Fuente A, Reuter M, Altabe S, Mulholland F, de Mendoza D, López P, Wells JM. 2005. Evidence that the essential response regulator YycF in *Streptococcus pneumoniae* modulates expression of fatty acid biosynthesis genes and alters membrane composition. *Journal of bacteriology* 187:2357-2367.
- Moker N, Brocker M, Schaffer S, Kramer R, Morbach S, Bott M. 2004. Deletion of the genes encoding the MtrA-MtrB two-component system of *Corynebacterium glutamicum* has a strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and expression of genes involved in osmoprotection. *Molecular microbiology* 54:420-438.
- Morlot C, Pernot L, Le Gouellec A, Di Guilmi AM, Vernet T, Dideberg O, Dessen A. 2005. Crystal structure of a peptidoglycan synthesis regulatory factor (PBP3) from *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of biological chemistry* 280:15984-15991.
- Moscoso M, García E, López R. 2006. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *Journal of bacteriology* 188:7785-7795.
- Nagahashi S, Nakayama H, Hamada K, Yang H, Arisawa M, Kitada K. 1997. Regulation by tetracycline of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 255:372-375.
- Neufeld F, Etinger-Tulczynska. 1931. Nasale Pneumokokkeninfektionen und Pneumokokkenkeimträger im Tierversuch. *Z Hyg Infektionskr* 112:492-526.
- Ng WL, Kazmierczak KM, Winkler ME. 2004. Defective cell wall synthesis in *Streptococcus pneumoniae* R6 depleted for the essential PcsB putative murein hydrolase or the VicR (YycF) response regulator. *Molecular microbiology* 53:1161-1175.
- Ng WL, Robertson GT, Kazmierczak KM, Zhao J, Gilmour R, Winkler ME. 2003. Constitutive expression of PcsB suppresses the requirement for the essential VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae* R6. *Molecular microbiology* 50:1647-1663.

- Ng WL, Tsui HC, Winkler ME. 2005. Regulation of the *pspA* virulence factor and essential *pcsB* murein biosynthetic genes by the phosphorylated VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology* 187:7444-7459.
- Ng WL, Winkler ME. 2004. Singular structures and operon organizations of essential two-component systems in species of *Streptococcus*. *Microbiology (Reading, England)* 150:3096-3098.
- Nieto C, Espinosa M. 2003. Construction of the mobilizable plasmid pMV158GFP, a derivative of pMV158 that carries the gene encoding the green fluorescent protein. *Plasmid* 49:281-285.
- Nieto C, Espinosa M, Puyet A. 1997. The maltose/maltodextrin regulon of *Streptococcus pneumoniae*. Differential promoter regulation by the transcriptional repressor MalR. *The Journal of biological chemistry* 272:30860-30865.
- Nieto C, Fernández de Palencia P, López P, Espinosa M. 2000. Construction of a tightly regulated plasmid vector for *Streptococcus pneumoniae*: controlled expression of the green fluorescent protein. *Plasmid* 43:205-213.
- Nieto C, Puyet A, Espinosa M. 2001. MalR-mediated regulation of the *Streptococcus pneumoniae* malMP operon at promoter PM. Influence of a proximal divergent promoter region and competition between MalR and RNA polymerase proteins. *The Journal of biological chemistry* 276:14946-14954.
- Nikaido H. 2001. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Seminars in cell & developmental biology* 12:215-223.
- Nunn WD, Giffin K, Clark D, Cronan JE, Jr. 1983. Role for *fadR* in unsaturated fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 154:554-560.
- Osborn MJ, Rothfield L. 2007. Cell shape determination in *Escherichia coli*. *Current opinion in microbiology* 10:606-610.
- Pao GM, Saier MH, Jr. 1997. Nonplastid eukaryotic response regulators have a monophyletic origin and evolved from their bacterial precursors in parallel with their cognate sensor kinases. *Journal of molecular evolution* 44:605-613.
- Parkinson JS, Kofoed EC. 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annual review of genetics* 26:71-112.
- Pasteur L. 1881. Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. *Bull Acad Med. Paris*. pp 94- 103.
- Paterson DL. 2006. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin Infect Dis* 43 Suppl 2:S43-48.
- Payne DJ, Warren PV, Holmes DJ, Ji Y, Lonsdale JT. 2001. Bacterial fatty-acid biosynthesis: a genomics-driven target for antibacterial drug discovery. *Drug discovery today* 6:537-544.
- Pearson BM, Pin C, Wright J, I'Anson K, Humphrey T, Wells JM. 2003. Comparative genome analysis of *Campylobacter jejuni* using whole genome DNA microarrays. *FEBS letters* 554:224-230.
- Pletz MW, Maus U, Krug N, Welte T, Lode H. 2008. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. *International journal of antimicrobial agents* 32:199-206.
- Poole K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 56:20-51.

- Poole K. 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of medicine* 39:162-176.
- Priebe SD, Lacks SA. 1989. Region of the streptococcal plasmid pMV158 required for conjugative mobilization. *Journal of bacteriology* 171:4778-4784.
- Pucci MJ. 2006. Use of genomics to select antibacterial targets. *Biochemical pharmacology* 71:1066-1072.
- Puyet A, Espinosa M. 1993. Structure of the maltodextrin-uptake locus of *Streptococcus pneumoniae*. Correlation to the *Escherichia coli* maltose regulon. *Journal of molecular biology* 230:800-811.
- Puyet A, Greenberg B, Lacks SA. 1990. Genetic and structural characterization of endA. A membrane-bound nuclease required for transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of molecular biology* 213:727-738.
- Puyet A, Ibanez AM, Espinosa M. 1993. Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* maltosaccharide regulator MalR, a member of the LacI-GalR family of repressors displaying distinctive genetic features. *The Journal of biological chemistry* 268:25402-25408.
- Reidl J, Boos W. 1991. The malX malY operon of *Escherichia coli* encodes a novel enzyme II of the phosphotransferase system recognizing glucose and maltose and an enzyme abolishing the endogenous induction of the maltose system. *Journal of bacteriology* 173:4862-4876.
- Reynolds R, Potz N, Colman M, Williams A, Livermore D, MacGowan A. 2004. Antimicrobial susceptibility of the pathogens of bacteraemia in the UK and Ireland 2001-2002: the BSAC Bacteraemia Resistance Surveillance Programme. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 53:1018-1032.
- Roberts MC. 2008. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS microbiology letters* 282:147-159.
- Robinson VL, Wu T, Stock AM. 2003. Structural analysis of the domain interface in DrrB, a response regulator of the OmpR/PhoB subfamily. *Journal of bacteriology* 185:4186-4194.
- Rock CO, Cronan JE. 1996. *Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis. *Biochimica et biophysica acta* 1302:1-16.
- Rolfes RJ, Zalkin H. 1988. *Escherichia coli* gene purR encoding a repressor protein for purine nucleotide synthesis. Cloning, nucleotide sequence, and interaction with the purF operator. *The Journal of biological chemistry* 263:19653-19661.
- Rolinson GN. 1982. The history and background of Augmentin. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde* 62:3A-4A.
- Rosenow C, Maniar M, Trias J. 1999. Regulation of the alpha-galactosidase activity in *Streptococcus pneumoniae*: characterization of the raffinose utilization system. *Genome research* 9:1189-1197.
- Rosey EL, Stewart GC. 1992. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the lacR, lacABCD, and lacFE genes encoding the repressor, tagatose 6-phosphate gene cluster, and sugar-specific phosphotransferase system components of the lactose operon of *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology* 174:6159-6170.
- Rossolini GM, Docquier JD. 2006. New beta-lactamases: a paradigm for the rapid response of bacterial evolution in the clinical setting. *Future microbiology* 1:295-308.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989a. *Molecular cloning. A laboratory manual*.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989b. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn.* . Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

- Schonert S, Seitz S, Krafft H, Feuerbaum EA, Andernach I, Witz G, Dahl MK. 2006. Maltose and maltodextrin utilization by *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 188:3911-3922.
- Schuck P. 2000. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophysical journal* 78:1606-1619.
- Schujman GE, Choi KH, Altabe S, Rock CO, de Mendoza D. 2001. Response of *Bacillus subtilis* to cerulenin and acquisition of resistance. *Journal of bacteriology* 183:3032-3040.
- Schujman GE, de Mendoza D. 2005. Transcriptional control of membrane lipid synthesis in bacteria. *Current opinion in microbiology* 8:149-153.
- Schujman GE, Guerin M, Buschiazzi A, Schaeffer F, Llarrull LI, Reh G, Vila AJ, Alzari PM, de Mendoza D. 2006. Structural basis of lipid biosynthesis regulation in Gram-positive bacteria. *The EMBO journal* 25:4074-4083.
- Schujman GE, Paoletti L, Grossman AD, de Mendoza D. 2003. FapR, a bacterial transcription factor involved in global regulation of membrane lipid biosynthesis. *Developmental cell* 4:663-672.
- Senadheera MD, Guggenheim B, Spatafora GA, Huang YC, Choi J, Hung DC, Treglown JS, Goodman SD, Ellen RP, Cvitkovitch DG. 2005. A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects gtfBCD, gbpB, and ftf expression, biofilm formation, and genetic competence development. *Journal of bacteriology* 187:4064-4076.
- Shakil S, Khan R, Zarrilli R, Khan AU. 2008. Aminoglycosides versus bacteria--a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *Journal of biomedical science* 15:5-14.
- Shemesh M, Tam A, Feldman M, Steinberg D. 2006. Differential expression profiles of *Streptococcus mutans* ftf, gtf and vicR genes in the presence of dietary carbohydrates at early and late exponential growth phases. *Carbohydrate research* 341:2090-2097.
- Simonian MH. 2001. Spectrophotometric determination of protein concentration. *Current Protocols in Protein Science*:3.1.1-3.1.7.
- Skerker JM, Perchuk BS, Siryaporn A, Lubin EA, Ashenberg O, Goulian M, Laub MT. 2008. Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems. *Cell* 133:1043-1054.
- Skerker JM, Prasol MS, Perchuk BS, Biondi EG, Laub MT. 2005. Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS biology* 3:e334.
- Song J, Abraham SN. 2008. Innate and adaptive immune responses in the urinary tract. *European journal of clinical investigation* 38 Suppl 2:21-28.
- Song Y, Peisach D, Pioszak AA, Xu Z, Ninfa AJ. 2004. Crystal structure of the C-terminal domain of the two-component system transmitter protein nitrogen regulator II (NRII; NtrB), regulator of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 43:6670-6678.
- Spellberg B, Powers JH, Brass EP, Miller LG, Edwards JE, Jr. 2004. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin Infect Dis* 38:1279-1286.
- Spoering AL, Gilmore MS. 2006. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Current opinion in microbiology* 9:133-137.



- Standish AJ, Stroehler UH, Paton JC. 2007. The pneumococcal two-component signal transduction system RR/HK06 regulates CbpA and PspA by two distinct mechanisms. *Journal of bacteriology* 189:5591-5600.
- Stassi DL, Dunn JJ, Lacks SA. 1982. Nucleotide sequence of DNA controlling expression of genes for maltosaccharide utilization in *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* 20:359-366.
- Stassi DL, López P, Espinosa M, Lacks SA. 1981. Cloning of chromosomal genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78:7028-7032.
- Sternberg G. 1881. A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human saliva. An experimental research. *Natl Board Health Bull.* pp 781- 783.
- Stewart PS, Franklin MJ. 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature reviews* 6:199-210.
- Stieger M, Wohlgensinger B, Kamber M, Lutz R, Keck W. 1999. Integrational plasmids for the tetracycline-regulated expression of genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* 226:243-251.
- Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. 2000. Two-component signal transduction. *Annual review of biochemistry* 69:183-215.
- Stock JB, Ninfa AJ, Stock AM. 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiological reviews* 53:450-490.
- Sullivan KF, Kay SA. 1999. *Green Fluorescent Proteins* San Diego: Academic Press; 1st edition.
- Sung CK, Li H, Claverys JP, Morrison DA. 2001. An rpsL cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Applied and environmental microbiology* 67:5190-5196.
- Sung CK, Morrison DA. 2005. Two distinct functions of ComW in stabilization and activation of the alternative sigma factor ComX in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology* 187:3052-3061.
- Suntharalingam P, Cvitkovitch DG. 2005. Quorum sensing in streptococcal biofilm formation. *Trends in microbiology* 13:3-6.
- Szurmant H, Fukushima T, Hoch JA, Melvin I, Simon BRCaAC. 2007a. The Essential YycFG Two[hyphen (true graphic)]Component System of *Bacillus subtilis*. *Methods in Enzymology*: Academic Press. pp 396-417.
- Szurmant H, Mohan MA, Imus PM, Hoch JA. 2007b. YycH and YycI interact to regulate the essential YycFG two-component system in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 189:3280-3289.
- Szurmant H, Nelson K, Kim EJ, Perego M, Hoch JA. 2005. YycH regulates the activity of the essential YycFG two-component system in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 187:5419-5426.
- Tanaka T, Saha SK, Tomomori C, Ishima R, Liu D, Tong KI, Park H, Dutta R, Qin L, Swindells MB, Yamazaki T, Ono AM, Kainosho M, Inouye M, Ikura M. 1998. NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ. *Nature* 396:88-92.
- Taylor BL, Zhulin IB. 1999. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:479-506.
- Taylor DE, Chau A. 1996. Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 40:1-5.
- Tenson T, Mankin A. 2006. Antibiotics and the ribosome. *Molecular microbiology* 59:1664-1677.

- Terzaghi BE, Sandine WE. 1975. Improved Medium for Lactic Streptococci and Their Bacteriophages. *Appl Microbiol* 29:807-813.
- Tettelin H, Nelson KE, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Peterson S, Heidelberg J, DeBoy RT, Haft DH, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn M, Kolonay JF, Nelson WC, Peterson JD, Umayam LA, White O, Salzberg SL, Lewis MR, Radune D, Holtzapple E, Khouri H, Wolf AM, Utterback TR, Hansen CL, McDonald LA, Feldblyum TV, Angiuoli S, Dickinson T, Hickey EK, Holt IE, Loftus BJ, Yang F, Smith HO, Venter JC, Dougherty BA, Morrison DA, Hollingshead SK, Fraser CM. 2001. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science (New York, NY)* 293:498-506.
- Tomasz A, Hotchkiss RD. 1964. Regulation of the Transformability of Pneumococcal Cultures by Macromolecular Cell Products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 51:480-487.
- Toro-Roman A, Mack TR, Stock AM. 2005a. Structural analysis and solution studies of the activated regulatory domain of the response regulator ArcA: a symmetric dimer mediated by the alpha4-beta5-alpha5 face. *Journal of molecular biology* 349:11-26.
- Toro-Roman A, Wu T, Stock AM. 2005b. A common dimerization interface in bacterial response regulators KdpE and TorR. *Protein Sci* 14:3077-3088.
- Trappetti C, Kadioglu A, Carter M, Hayre J, Iannelli F, Pozzi G, Andrew PW, Oggioni MR. 2009. Sialic Acid: A Preventable Signal for Pneumococcal Biofilm Formation, Colonization, and Invasion of the Host. *The Journal of infectious diseases* 199:1497-1505.
- Ulijasz AT, Andes DR, Glasner JD, Weisblum B. 2004. Regulation of iron transport in *Streptococcus pneumoniae* by RitR, an orphan response regulator. *Journal of bacteriology* 186:8123-8136.
- Van den Ent F, Leaver M, Bendezu F, Errington J, de Boer P, Lowe J. 2006. Dimeric structure of the cell shape protein MreC and its functional implications. *Molecular microbiology* 62:1631-1642.
- Van der Lelie D, Wosten HA, Bron S, Oskam L, Venema G. 1990. Conjugal mobilization of streptococcal plasmid pMV158 between strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal of bacteriology* 172:47-52.
- Van der Meer JR, Polman J, Beerthuyzen MM, Siezen RJ, Kuipers OP, De Vos WM. 1993. Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes *nisP*, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *Journal of bacteriology* 175:2578-2588.
- Viegas SC, Fernández De Palencia P, Amblar M, Arraiano CM, López P. 2004. Development of an inducible system to control and easily monitor gene expression in *Lactococcus lactis*. *Plasmid* 51:256-264.
- Wagner C, Saizieu Ad A, Schonfeld HJ, Kamber M, Lange R, Thompson CJ, Page MG. 2002. Genetic analysis and functional characterization of the *Streptococcus pneumoniae* *vic* operon. *Infection and immunity* 70:6121-6128.
- Wang B, Kuramitsu HK. 2005. Inducible antisense RNA expression in the characterization of gene functions in *Streptococcus mutans*. *Infection and immunity* 73:3568-3576.
- Webb AJ, Homer KA, Hosie AH. 2007. A phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system is the principal maltose transporter in *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology* 189:3322-3327.

- Ween O, Gaustad P, Havarstein LS. 1999. Identification of DNA binding sites for ComE, a key regulator of natural competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular microbiology* 33:817-827.
- Weis F, Beiras-Fernández A, Schelling G. 2008. Daptomycin, a lipopeptide antibiotic in clinical practice. *Curr Opin Investig Drugs* 9:879-884.
- West AH, Stock AM. 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in biochemical sciences* 26:369-376.
- Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science (New York, NY)* 295:1487.
- Wilson DN, Harms JM, Nierhaus KH, Schlunzen F, Fucini P. 2005. Species-specific antibiotic-ribosome interactions: implications for drug development. *Biological chemistry* 386:1239-1252.
- Wright GD. 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature reviews* 5:175-186.
- Yamamoto K, Shibahara A, Nakayama T, Kajimoto G. 1991. Determination of double-bond positions in methylene-interrupted dienoic fatty acids by GC-MS as their dimethyl disulfide adducts. *Chemistry and Physics of Lipids* 60:39-50.
- Zahrt TC, Deretic V. 2000. An essential two-component signal transduction system in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of bacteriology* 182:3832-3838.
- Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. 2008. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS microbiology reviews* 32:361-385.
- Zhang L, Fan F, Palmer LM, Lonetto MA, Petit C, Voelker LL, St John A, Bankosky B, Rosenberg M, McDevitt D. 2000. Regulated gene expression in *Staphylococcus aureus* for identifying conditional lethal phenotypes and antibiotic mode of action. *Gene* 255:297-305.
- Zhang YM, Marrakchi H, Rock CO. 2002. The FabR (YijC) transcription factor regulates unsaturated fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 277:15558-15565.
- Zhang YM, Rock CO. 2008. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature reviews* 6:222-233.
- Zhou L, Lei XH, Bochner BR, Wanner BL. 2003. Phenotype microarray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems. *Journal of bacteriology* 185:4956-4972.
- Zhulin IB, Taylor BL, Dixon R. 1997. PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends in biochemical sciences* 22:331-333.
- Zilhao R, Cairrao F, Regnier P, Arraiano CM. 1996. PNPase modulates RNase II expression in *Escherichia coli*: implications for mRNA decay and cell metabolism. *Molecular microbiology* 20:1033-1042.



**PUBLICACIONES**



## Enhancement of 2-methylbutanal formation in cheese by using a fluorescently tagged Lacticin 3147 producing *Lactococcus lactis* strain

Pilar Fernández de Palencia<sup>a,b</sup>, Marta de la Plaza<sup>b</sup>, M. Luz Mohedano<sup>a</sup>,  
M. Carmen Martínez-Cuesta<sup>b</sup>, Teresa Requena<sup>b</sup>, Paloma López<sup>a</sup>, Carmen Peláez<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Estructura y Función de Proteínas, Centro de Investigaciones Biológicas (C.S.I.C.),  
Avda. Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup>Departamento de Ciencia y Tecnología de Productos Lácteos, Instituto del Frío (C.S.I.C.), José Antonio Novais 10,  
28040 Madrid, Spain

Received 23 July 2003; received in revised form 3 November 2003; accepted 10 November 2003

### Abstract

The amino acid conversion to volatile compounds by lactic acid bacteria is important for aroma formation in cheese. In this work, we analyzed the effect of the lytic bacteriocin Lacticin 3147 on transamination of isoleucine and further formation of the volatile compound 2-methylbutanal in cheese. The Lacticin 3147 producing strain *Lactococcus lactis* IFPL3593 was fluorescently tagged (IFPL3593-GFP) by conjugative transfer of the plasmid pMV158GFP from *Streptococcus pneumoniae*, and used as starter in cheese manufacture. Starter adjuncts were the bacteriocin-sensitive strains *L. lactis* T1 and *L. lactis* IFPL730, showing branched chain amino acid aminotransferase and  $\alpha$ -keto acid decarboxylase activity, respectively. Adjunct strains were selected to complete the isoleucine conversion pathway and, hence, increase formation of 2-methylbutanal conferring aroma to the cheese. The non-bacteriocin-producing strain *L. lactis* IFPL359-GFP was included as starter in the control batch. Fluorescent tagging of the starter strains allowed their tracing in cheese during ripening by fluorescence microscopy and confocal scanning laser microscopy. The bacteriocin produced by *L. lactis* IFPL3593-GFP enhanced lysis of the adjuncts with a concomitant increase in isoleucine transamination and about a two-fold increase of the derived volatile compound 2-methylbutanal. This led to an enhancement of the cheese aroma detected by a sensory panel. The improvement of cheese flavour and aroma may be of significant importance for the dairy industry.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Cheese aroma; Lacticin 3147; Green fluorescent protein

### 1. Introduction

Free amino acids formed by proteolysis of casein contribute to the taste of ripened cheeses or can be converted into cheese flavour compounds (Christensen et al., 1999; McSweeney and Sousa, 2000). To

\* Corresponding author. Tel.: +34-91-549-2300; fax: +34-91-549-3627.

E-mail address: [cpelaez@if.csic.es](mailto:cpelaez@if.csic.es) (C. Peláez).

achieve a good cheese flavour, it is necessary to have a balanced concentration of a wide range of aromatic compounds. In lactococci, branched chain amino acids (BCAAs) are primarily converted into  $\alpha$ -keto acids by transamination (Yvon et al., 1997, 2000; Atilas et al., 2000) which are further converted into hydroxyacids or into flavour compounds such as carboxylic acids by an oxidative decarboxylation, or the methylaldehydes 2- and 3-methylbutanal and 2-methylpropanal by a non-oxidative decarboxylation (Yvon and Rijnen, 2001). The aldehydes can be further reduced to alcohols or oxidized to carboxylic acids. Enzymatic decarboxylation of  $\alpha$ -keto acids is not a common feature in cheese microorganisms. However, conversion of  $\alpha$ -keto acids to aldehydes may be chemically feasible (Koga et al., 1992; Nierop Groot and de Bont, 1998) and  $\alpha$ -keto acid decarboxylating activity has been characterized in bacteria *Enterobacter cloacae* (Koga et al., 1992) and yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* (Schure et al., 1998). Concerning the lactococci, decarboxylation of  $\alpha$ -keto- $\beta$ -methyl-*n*-valeric acid (KMVA) to methyl aldehydes was first reported in *Lactococcus lactis* var. *maltingenes* (Morgan, 1976). Later work has shown that most lactococci produce only small amounts of aldehydes (Yvon and Rijnen, 2001) and, in recent years, the ability of some particular lactococcal strains to produce aldehydes by decarboxylation of  $\alpha$ -keto acids has reactivated the subject (Ayad et al., 1999; Amárita et al., 2001). Although formation of 2- and 3-methylaldehydes is considered responsible for malty off-flavours in Cheddar cheese (Morgan, 1976), these aldehydes are a major part of the volatile fraction of several cheeses such as Cheddar, Camembert, Emmental, and Parmesan (Barbieri et al., 1994; Yvon and Rijnen, 2001; Thierry and Maillard, 2002), suggesting that the overall acceptance of these compounds depends on the final balance of volatiles in the cheese.

Since the ability of lactic acid bacteria to degrade amino acids is strain-dependent, the selection of starter or adjuncts with unique amino acid catabolic activities has been proposed (Ayad et al., 2001). Additionally, cell lysis favours accessibility of the intracellular enzymes to their substrates and potentially enhances bacterial enzymatic activity. In this regard, one of the most interesting approaches is the use of bacteriocins (Martínez-Cuesta et al., 1997, 1998; Morgan et al., 1995, 1997). We have demonstrated

that Lacticin 3147 has a lytic effect by causing pores in the cytoplasmic membrane of lactococcal-sensitive cells and, hence, promoting uncontrolled degradation of the cell walls by the lactococcal autolysin AcmA (Martínez-Cuesta et al., 2000). In a previous work, we constructed the *L. lactis* IFPL3593 transconjugant that produces Lacticin 3147, by transfer of the bacteriocin coding plasmid pBAC105 from *L. lactis* IFPL105 (Martínez-Cuesta et al., 2001). The bacteriocin producer *L. lactis* IFPL3593 accelerated cheese proteolysis during ripening by causing lysis of peptidolytic adjunct strains. The starter strain *L. lactis* IFPL359 (parental of the transconjugant IFPL3593) is also sensitive to the lytic action of the Lacticin 3147 (Martínez-Cuesta et al., 2000). Recent work has shown that the bacteriocin caused membrane permeabilization of *L. lactis* IFPL359, which facilitated free diffusion of amino acids into the cell, and further cell lysis (Martínez-Cuesta et al., 2002). Both facts, cell permeabilization and lysis, render the amino acid converting enzymes more accessible to their substrates and hence, an increased isoleucine transamination was observed. These results suggested the possibility to enhance flavour formation in cheese by combination of the constructed strain *L. lactis* IFPL3593 that produces Lacticin 3147, and strains sensitive to the bacteriocin having complementary action on the isoleucine metabolism.

Fluorescent labelling of a constructed strain can provide useful methods to allow its detection during cheese ripening. In previous research we have reported the detection of lactococcal cells carrying the *gfp* (gene encoding green fluorescent protein, GFP) from the jellyfish *A. victoria* by fluorescent microscopy during its growth in milk (Fernández de Palencia et al., 2000; Nieto et al., 2000). This preliminary result suggested that GFP could be used as a fluorescent-tag for monitoring the growth of the Lacticin 3147 producer *L. lactis* IFPL3593 during cheese ripening.

In the present work, the effect of Lacticin 3147 on transamination of isoleucine and further formation of the volatile compound 2-methylbutanal in cheese was studied. The Lacticin 3147 producer *L. lactis* IFPL3593 was used as starter and two other lactococcal strains, sensitive to the bacteriocin and showing complementary action on isoleucine catabolism, were used as starter adjuncts. *L. lactis* IFPL3593 and *L.*



*lactis* IFPL359 (non-producing bacteriocin), were tagged with the fluorescent protein GFP to monitor them during cheese ripening.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains, plasmids, and growth conditions

The *L. lactis* strains used in this study were: the Lacticin 3147-producing transconjugant IFPL3593 (Martínez-Cuesta et al., 2001); its wild-type parental strain IFPL359; strain T1, which is a Lac<sup>−</sup> Prt<sup>−</sup> (lactose- and proteinase-deficient) variant of IFPL359 (Requena and McKay, 1993); strain IFPL730 with high  $\alpha$ -keto acid decarboxylase activity (Amárita et al., 2001), and the tagged strains IFPL 3593-GFP and IFPL359-GFP constructed in this work. Lactococci were grown (up to 9 log cfu/ml) at 30 °C in M17 broth (Oxoid, Basingstoke, UK), containing 8 g/l glucose (GM17).

*Streptococcus pneumoniae* R61 (Lacks, 1968), containing pMV158GFP and pAM $\beta$ 1 plasmids, was used as donor bacteria in conjugation experiments. *S. pneumoniae* was grown to 9.12 log cfu/ml in AGCH medium (Lacks, 1968) supplemented with 2.5 g/l yeast extract and 8 g/l sucrose (AGCHYS). When required, the media contained tetracycline (1  $\mu$ g/ml) and/or erythromycin (5 or 1  $\mu$ g/ml for *L. lactis* or *S. pneumoniae*, respectively). Plasmid pMV158GFP is a derivative of the mobilizable plasmid pMV158 (Burdet, 1980), which contains the P<sub>M-gfp</sub> cassette of pLS1RGFP (Nieto et al., 2000). Construction of the plasmid was described elsewhere (Nieto and Espinosa, 2003).

Growth of the cells was monitored by measuring the change in optical density (OD) of the cultures at 660 or 650 nm for *L. lactis* or *S. pneumoniae*, respectively, in a spectrophotometer (Spectronic 20D, Milton Roy, Rochester, USA).

### 2.2. Conjugation experiments

Intergeneric matings between *S. pneumoniae*, containing pAM $\beta$ 1 and pMV158GFP, and *L. lactis* IFPL359 or IFPL3593 strains, were performed as follows: *S. pneumoniae* was grown at 37 °C in

AGCHYS, supplemented with erythromycin and tetracycline, to an OD<sub>650</sub> of 0.5 (9.12 log cfu/ml) and *L. lactis* was grown at 30 °C in GM17 to an OD<sub>660</sub> of 0.5 (9.63 log cfu/ml). Then, donor and recipient cultures were independently sedimented by centrifugation at 6000  $\times$  g for 10 min and resuspended in AGCH medium, adjusted to contain 10 mM MgCl<sub>2</sub> and bovine serum albumin at 2 mg/ml (AGCHMB). Donor (0.2 ml) and recipient (2 ml) bacteria were gently mixed with a pipette in an eppendorf tube and filtered onto sterile 13 mm diameter nitrocellulose filters (0.22  $\mu$ m; Millipore, Bedford, USA), placed cell-side up on AGCHMB-agar plates supplemented with glucose (2 g/l) and DNase I (Roche, Mannheim, Germany) at 10  $\mu$ g/ml, and incubated for 4 h at 37 °C. Cells were recovered from the filter by washing with 1 ml AGCHMB medium supplemented with 0.1 g/ml glycerol. The washings were plated on agar GM17 containing tetracycline, erythromycin or both antibiotics to test for the presence of pMV158GFP, pAM $\beta$ 1, or both plasmids. Transconjugants were allowed to grow on the agar for 48 h at 30 °C. The presence of plasmids was confirmed by electrophoretical analysis on 0.6% agarose gels of alkaline lysates prepared as described (Birnboim and Doly, 1979). The expression of GFP by the transconjugants was tested by measuring the fluorescence of the cells on a LS-50B spectrophotometer (Perkin Elmer, Shelton, USA) by excitation at 488 nm with a slit of 2.5 nm, and detection of emission at 511 nm with slit of 10 nm, as previously described (Fernández de Palencia et al., 2000). Cultures were grown to an OD<sub>660</sub> of 0.5, cells were sedimented by centrifugation at 6000  $\times$  g for 10 min, washed and resuspended to the original volume in PBS buffer (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 3 mM KCl), pH 8.0, prior to measurement of fluorescence. As a background, cells of the parental strains lacking pMV158GFP were used and their values of fluorescence were subtracted from cells harbouring pMV158GFP. The transconjugants *L. lactis* IFPL359-GFP and IFPL3593-GFP, both expressing GFP, were selected for further analysis prior usage as starters in cheese-making trials.

### 2.3. Cheese manufacture

Laboratory-scale cheese-making trials were carried out using commercial pasteurized cow's milk. Milk

(10 l per batch) was heated to 32 °C, supplemented with 0.2 g/l CaCl<sub>2</sub>, and inoculated with 7.3 log cfu/ml of an overnight culture of *L. lactis* IFPL359-GFP (batch C) or its Lacticin 3147-producing transconjugant *L. lactis* IFPL3593-GFP (batch Bac), in skimmed milk. After 30 min incubation, the cheese vat milk was inoculated with an exponentially growing culture (OD<sub>660</sub> of 0.7) of the adjuncts *L. lactis* T1 (8 log cfu/ml) (Lac<sup>-</sup> Prt<sup>-</sup>) and *L. lactis* IFPL730 (7.3 log cfu/ml) grown in GM17 broth, centrifuged at 6000 × g for 10 min, washed with autoclaved distilled water, and resuspended in the milk. Renneting was initiated by adding 0.025 g/l of chymosin (CHY-MAX 2080 IMCU/g, Chr. Hansen, Hørsholm, Denmark). Curd was cut, heated to 37 °C, scooped into cylindrical moulds and pressed for 90 min. When the curds reached pH 5.4, they were immersed for 2 h at room temperature in a sterile brine containing 100 g/l NaCl, 10 g/l α-ketoglutarate, and 10 g/l isoleucine. The obtained cheeses of 200 g were drained overnight at 4 °C and ripened at 10–12 °C and 85–90% relative humidity. The cheeses were analyzed in triplicate at 1, 7, 15, 30, and 45 days of ripening.

#### 2.4. Microbiological analysis and detection of the bacteriocin

Cheeses were analyzed in accordance with the standards of the International Dairy Federation (1985). Lactococcal colony forming units were determined using bromocresol-purple lactose indicator agar (BCPL; McKay et al., 1970). After 24 h of incubation at 30 °C, lactococci formed yellow colonies due to their lactose-positive phenotype with the exception of *L. lactis* T1 (Lac<sup>-</sup> Prt<sup>-</sup>) colonies, which were white. *L. lactis* IFPL359-GFP, *L. lactis* IFPL3593-GFP were enumerated by transfer of yellow colonies onto BCPL-agar containing tetracycline at 1 µg/ml.

Bacteriocin activity in cheese was determined in samples of 0.5 g of cheese homogenized with 500 µl of 40% isopropanol in a vortex for 5 min. After centrifugation (10,000 × g for 10 min), 50 µl of supernatant was dispensed into wells of uniform diameter (7 mm) bored in M17-Lactose (M17-L) agar plates and sealed with tempered soft agar (45 °C). Plates were overlaid with a lawn of molten M17-L agar seeded with the indicator strain (*L. lactis* IFPL359) and incubated overnight at 30 °C. Bacteriocin activity was expressed

as the area (mm<sup>2</sup>) of inhibition surrounding each agar well. Control samples were cheeses manufactured with the isogenic strain *L. lactis* IFPL359GFP that no produces the bacteriocin.

#### 2.5. Detection of GFP-fluorescently tagged lactococci by fluorescence and confocal scanning laser microscopy

For detection of GFP-fluorescently tagged bacteria, the lactococcal cells grown in GM17 broth to an OD<sub>660</sub> of 0.4 were sedimented by centrifugation at 6000 × g for 10 min, washed, and resuspended to original volume in PBS buffer, pH 8.0. Cells were analyzed directly without fixing by phase-contrast or fluorescence microscopy with a Zeiss Axioplan Universal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) with an excitation Standard FITC set D480/30 and emission TBP 460/530/610 fluorescent filters. GFP was detected by excitation at 495 nm and detection of emission at 530 nm. Representative areas of each sample, such as those depicted in Figs. 2 and 4, were imaged using a × 100 magnification objective with a numerical aperture of 1.25.

The GFP fluorescence expressed by lactococcal cells is impaired at external pH below 5.2, although it can be recovered by suspension of the cells in PBS buffer (pH 8.0) (Fernández de Palencia et al., 2000). Therefore, to improve detection of fluorescently tagged bacteria due to the low pH values reached in the cheeses, 0.4 g of cheese were homogenized with 1 ml of PBS buffer (pH 8.0), and incubated for 5 min at 30 °C. Cells and cheese samples were sedimented by centrifugation at 6000 × g for 10 min and washed twice in PBS buffer. After increasing the pH of the samples, and for detection of tagged and non-tagged bacteria, the genome of the bacteria was stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride:hydrate (DAPI) reactive (Sigma-Genosys, Cambridge, UK) during 15 min at 20 °C, prior to cell-detection by microscopy. Analysis was performed by conventional fluorescence microscopy (as described above), selecting the appropriate excitation and emission filters for detection of GFP (495 and 530 nm) or DNA (400 and 460 nm). In addition, cheese sample areas were imaged for detection of GFP by a confocal scanning laser microscope Zeiss Axiovert 135 using a × 100 magnification objective with a numerical aperture of

2.5. Confocal illumination was provided by an Ar laser (488 nm laser excitation) with an OG 515 nm filter (green fluorescence signal). Image analysis was performed on CSLM images using a confocal system MRC 1024 Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, USA) for image acquisition and processing.

## 2.6. Physicochemical and enzyme analyses

The pH of cheeses was determined using a Metrohm Model 691 pH meter (Metrohm, Herisau, Switzerland) using 1 g of cheese homogenized with 5 ml of distilled water. Total solids were dried to constant weight at  $102 \pm 2$  °C for gravimetric determination (International Dairy Federation, 1982). Amino nitrogen was determined from the non-protein nitrogen fraction as described by Church et al. (1983) by reaction with *o*-phthalaldehyde (OPA). Determination of NaCl content was carried out as described by Yvon et al. (1998) by using the Sigma diagnostics chloride reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Release of X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase (PepX) into the cheese matrix was used as cellular lysis marker. The enzyme extract was obtained by vortexing 5 g of cheese with 5 ml of 50 mM Tris–HCl buffer (pH 7.0) as previously described (Martínez-Cuesta et al., 2001). PepX activity was measured in 100 µl of extract using 100 µl of 1 mM Gly–Pro-*p*-nitroanilide (Sigma) solution in 50 mM Tris–HCl buffer (pH 7.0) as substrate and 300 µl of the Tris–HCl buffer. The incubation was carried out at 37 °C in a Peltier CPS-240A temperature controller in a model UV-1601 spectrophotometer (Shimadzu, Columbia, USA). Release of *p*-nitroaniline was measured as the increase in absorbance at 410 nm ( $E_{410} = 8.800$  l mol<sup>−1</sup> cm<sup>−1</sup>) and PepX activity was expressed as

micromoles of product released per minute, per milliliter of extract (U/ml).

## 2.7. Analysis of α-keto-β-methyl-*n*-valeric acid and 2-methylbutanal

The α-keto-β-methyl-*n*-valeric acid (KMVA) was obtained from 1.25 g of cheese vortexed for 2 min with 5 ml of 0.2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, centrifuged at  $14,000 \times g$  for 15 min at 4 °C and the supernatant filtered through a 0.45 µm pore size filter (Millipore). 2-Methylbutanal was extracted from cheese by homogenizing with ethyl acetate (1:1; wt/vol) and treated by derivatisation with 2,4-dinitrophenylhydrazine to form the corresponding dinitrophenyl hydrazone derivative, as described by Kuntz et al. (1998). KMVA and 2-methylbutanal were analyzed by Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) using a Jasco RP-HPLC system (Jasco, Tokyo, Japan). Reaction products were separated using a Luna C18-2 analytical column (250 × 4.6 mm, 5 µm) (Phenomenex, Torrance, USA) held at 40 °C. Analysis of KMVA was performed according to Olalla-Herrera et al. (1993) by means of an isocratic elution of compounds at a flow rate of 1 ml/min using 0.2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in Milli-Q water (Millipore) as mobile phase. Optical density was measured at 210 nm. Chromatographic analysis of 2-methylbutanal was performed according to Schmidt et al. (1983) by means of an isocratic elution using as mobile phase 60% acetonitrile in Milli-Q water at a flow rate of 1.5 ml/min at 40 °C and measuring the optical density at 365 nm. KMVA and 2-methylbutanal were identified by comparing retention times with those of appropriate standard compounds. Data acquisition and processing were performed using Borwin chromatography software (JBMS Développements, Grenoble, France).

Table 1  
Summary of conjugal transfers

Strain		Counts (cfu/ml) <sup>a</sup>			
Donor	Recipient	Donor	Recipient	Transconjugants	
				Tet <sup>R</sup>	Erm <sup>R</sup>
<i>S. pneumoniae</i> PMV158GFP/pAMβ1	<i>L. lactis</i> 3593	$(3.74 \pm 0.81) \times 10^7$	$(3.73 \pm 1.9) \times 10^9$	$(2.30 \pm 0.65) \times 10^2$	$(1.45 \pm 0.74) \times 10^3$
<i>S. pneumoniae</i> PMV158GFP/pAMβ1	<i>L. lactis</i> 359	$(4.90 \pm 2.05) \times 10^7$	$(4.12 \pm 2.08) \times 10^9$	$(2.53 \pm 0.62) \times 10^2$	$(9.6 \pm 4.10) \times 10^2$

Tet<sup>R</sup>, tetracycline-resistant; Erm<sup>R</sup>, erythromycin-resistant.

Frequency data are the averages of three separate experiments.

<sup>a</sup> Total number of donor, recipient or transconjugant cfu recovered per milliliter of cell suspension.

### 2.8. Sensory analysis

Six panelists were previously trained for detection of 2-methylbutanal by sniffing homogenates of cheese samples in water at 0 days of ripening, containing increased amounts of the aldehyde (up to 250 µg/g). At different intervals during ripening, samples of experimental cheeses were frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  in screw cap tubes. For sensorial evaluation, the samples were thawed overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . Panelists were requested to score aroma detection in homogenates of cheese samples in water (1:1 wt/vol) at room temperature. Aroma evaluation scale was from 0 (absent) to 10 (very strong).

### 2.9. Statistical analysis

Statistical analysis of results was performed using one-way analysis of variance (Statgraphics Plus 2.1; Statistical Graphics, Rockville, USA) to determine significant differences ( $P < 0.05$ ) between batches in cheese composition, KMVA, 2-methylbutanal and aroma evaluation.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Construction and detection of fluorescently labelled starter strains

The expression of the autofluorescent protein GFP in the bacteriocin-producing starter *L. lactis* IFPL3593 was carried out to discriminate this microorganism from the lactococcal adjuncts T1 and IFPL730 during cheese ripening. For this, we developed a method for the mobilization conjugative transfer of plasmid pMV158GFP from *S. pneumoniae* to *L. lactis* (see details in Materials and methods). This method includes the use of GM17 plating medium, which allows growth of the transconjugants but not of *S. pneumoniae* and, therefore, it does not require a selective marker in the recipient strain. The summary of conjugal matings is shown in Table 1. The lactococcal strains IFPL3593 and its parental IFPL359 (bacteriocin non-producer) were the recipients for the plasmids pMV158GFP and pAMB1 harboured by the donor strain *S. pneumoniae* R61. The viability of *L. lactis* recipient strains did not

decrease during the mating period, while viable counts of the donor after conjugal transfer were approximately 35% of the initial count (data not shown). The mobilization of the non-conjugative pMV158GFP (tetracycline-resistant) by the plasmid pAMB1 was similar in both strains IFPL359 and IFPL3593, and six-fold lower than the frequency of erythromycin-resistant transconjugants (Table 1). Plasmid analysis of IFPL3593 and one of the tetracycline transconjugants is shown in Fig. 1. As expected from previous work (Requena and McKay, 1993), several plasmids were detected in strain IFPL3593 (Fig. 1, lane 1). In addition to those plasmids, bands migrating to the same position as covalently closed and open circle forms of pMV158GFP (Fig. 1, lane 3) were detected in the IFPL3593 transconjugant (Fig. 1, lane 2). Analysis of 12 tetracycline-resistant transconjugants showed

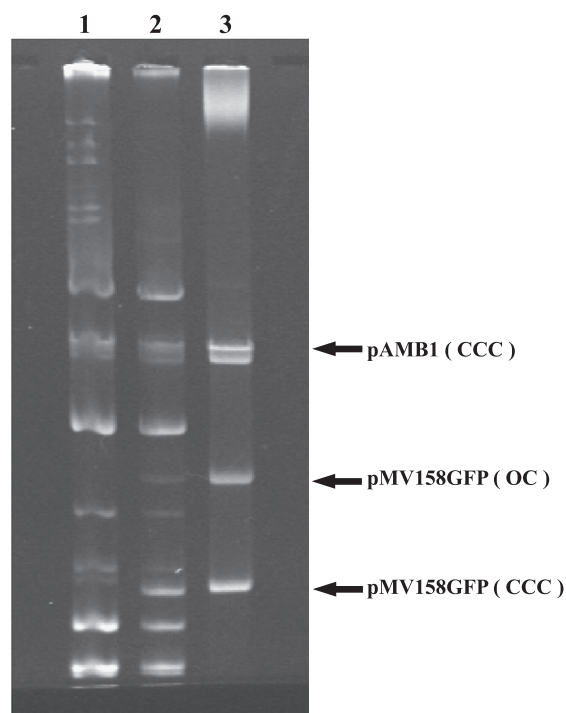


Fig. 1. Detection of pMV158GFP in *L. lactis* IFPL3593-GFP transconjugant. Agarose gel analysis of plasmid content of *L. lactis* IFPL3593 recipient strain (lane 1), *L. lactis* IFPL3593-GFP transconjugant (lane 2) and *S. pneumoniae* R61/pMV158GFP, pAMB1 donor strain (lane 3). Positions of covalently closed forms of the plasmids (CCC) and open circle forms of the pMV158GFP plasmid (OC) are indicated.



that 60% were also erythromycin-resistant (results not shown). This result reveals that in these cells, both plasmids were co-transferred. One transconjugant of *L. lactis* IFPL3593 (IFPL3593-GFP) and another of IFPL359 (IFPL359-GFP), harbouring pMV158GFP but not pAM $\beta$ 1, were selected for further analysis, prior to their use as starters in cheese-making trials. Expression of GFP did not affect the growth of IFPL3593-GFP and IFPL359-GFP in GM17 medium compared with their parental strains, having both a doubling time of  $36 \pm 9.2$  min during the exponential phase of growth. Lactococcal cells grown in GM17 medium were directly analyzed by phase-contrast and fluorescence microscopy (Fig. 2). The GFP synthesized by IFPL3593-GFP allowed its discrimination from T1 and IFPL730 (Fig. 2D) or from its parental strain IFPL3593 (Fig. 2E).

In conclusion, pMV158GFP was shown to be suitable for the fluorescent-tagging of lactococci. Moreover, the method developed for conjugative transfer from *S. pneumoniae* to *L. lactis* could be of general use for transfer of conjugative and mobi-

lizable plasmids to lactococcal strains of industrial interest refringent to electroporation. The general application of intergeneric conjugation from *S. pneumoniae* to other lactic acid bacteria is currently under investigation.

### 3.2. Cheese composition and microbiology

Cheese manufacture was carried out with a defined bacterial system consisting of the Lacticin 3147 producer *L. lactis* IFPL3593-GFP, as a starter culture to cause cell lysis, and the adjuncts *L. lactis* T1 and *L. lactis* IFPL730 that are sensitive to the bacteriocin. Adjuncts were added to the cheese vat after being grown up to the mid-log phase, which is the stage of maximum sensitivity to the bacteriocin (Martínez-Cuesta et al., 1997). The starter used in the control batch was the bacteriocin non-producer *L. lactis* IFPL359-GFP.

Use of the bacteriocin producer IFPL3593-GFP as cheese starter did allow proper acidification during the manufacturing process. After pressing, the composi-

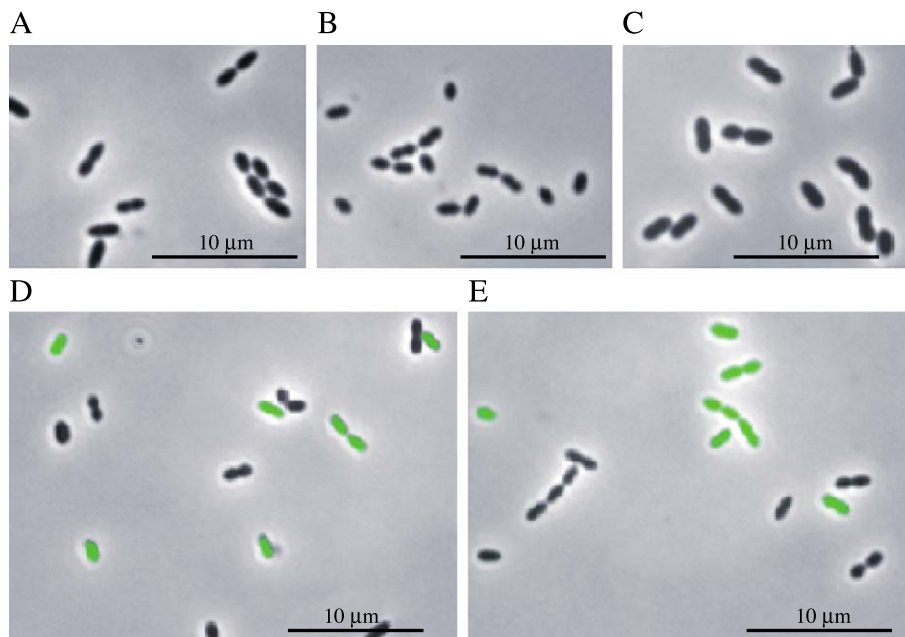


Fig. 2. Detection of expression of GFP by fluorescence microscopy. Exponential cultures of lactococcal cells grown in M17 medium were directly analyzed by phase-contrast and fluorescence microscopy. *L. lactis* IFPL3593-GFP (A), *L. lactis* T1 (B) and *L. lactis* IFPL730 (C) strains were detected by phase-contrast. Digital impose (overlay) of phase-contrast and fluorescent images of mixed lactococcal cultures containing IFPL3593-GFP, T1 and IFPL730 strains (D) or IFPL3593-GFP and IFPL3593 (E).

tion of the cheeses did not differ significantly ( $P > 0.05$ ) from the control; the average pH was 5.4 ( $\pm 0.10$ ) and the average value of dry matter was 47.7% ( $\pm 1.92$ ).

Fig. 3 shows that IFPL3593-GFP and IFPL359-GFP had a similar viability throughout cheese ripening. Evolution of both adjuncts, *L. lactis* T1 and IFPL730, varied depending on the cheese. Adjuncts viability in cheeses manufactured with IFPL3593-GFP was lower than that in the control cheese from the beginning of ripening, indicating that the bacteriocin effect had already started during cheese manufacture.

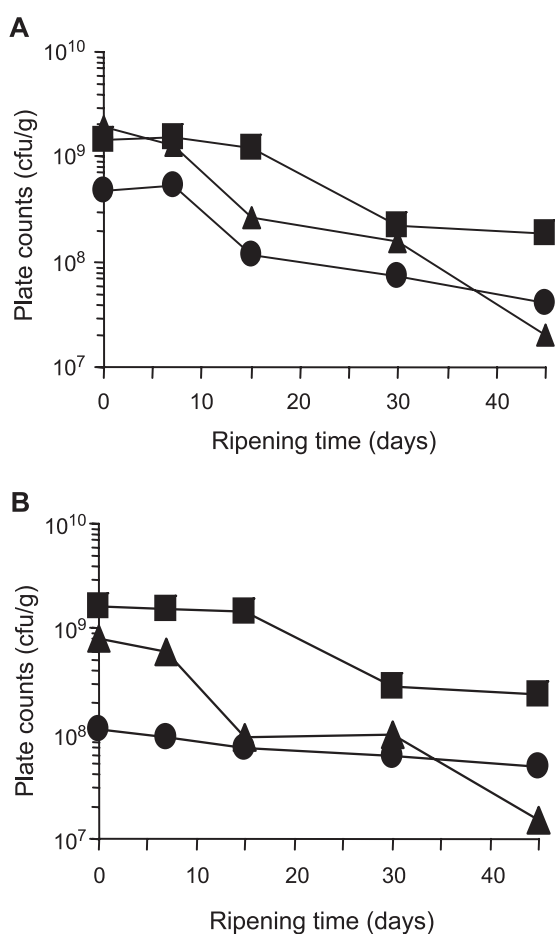


Fig. 3. Evolution of *L. lactis* IFPL359-GFP or *L. lactis* IFPL3593-GFP (■), *L. lactis* IFPL730 (●), and *L. lactis* T1 (▲) during ripening of cheeses manufactured with the non-bacteriocin-producer starter (A) and the Lacticin 3147-producer starter (B).

Visualization in situ of the GFP-labelled strains in cheese was possible using the optical sectioning capability of confocal scanning laser microscopy, which has the advantage of increased sensitivity, thus enabling observations of the subsurface structures of foods (Auty et al., 2001) and by conventional fluorescence microscopy. As an example, Fig. 4 shows detection of bacteria during cheese ripening. GFP fluorescence allowed identification of starter bacteria by confocal microscopy (IFPL3593-GFP in Fig. 4A and IFPL359-GFP in Fig. 4B, at 0 days of ripening). After staining with DAPI, the bacterial genome was visualized by conventional fluorescence microscopy during the ripening period (Fig. 4C, E, G and I). Also, with this technique, GFP-tagged starters could be detected at 0 days of ripening by the fluorescence conferred by GFP (IFPL3593-GFP in Fig. 4D). After 15 days of ripening, when the pH of the cheese decreased to 4.8, the fluorescence of GFP was impaired, as expected from previous results (Fernández de Palencia et al., 2000). To overcome this problem, the pH of the samples was increased and fluorescence was recovered. This method allowed the monitoring of the GFP-labelled bacteria during the entire ripening period (IFPL3593-GFP in Fig. 4F, H and J). Moreover, comparison of the images of a cheese sample for detection of DAPI (Fig. 4C, E, G and I) or GFP (Fig. 4F, H and J) allowed discrimination of GFP-tagged starter from other bacteria. These results show for the first time that strains of industrial interest harbouring plasmids encoding *gfp* gene could be directly monitored in cheese by conventional fluorescence and confocal scanning laser microscopy.

### 3.3. Release of intracellular enzymes, bacteriocin detection and proteolysis in cheese

Fig. 5A shows release of the intracellular PepX activity and bacteriocin detection in cheeses during ripening. Measurement of PepX activity in cheese matrix is considered an indicator of cell lysis (Chapot-Chartier et al., 1994). Values of PepX were significantly higher ( $P < 0.05$ ) in cheeses made with the bacteriocin producer due to the lytic effect of the bacteriocin. The enzymatic activity peaked at 7 days of ripening. At this point, the maximum levels of bacteriocin were observed in cheeses manufactured with IFPL3593-GFP. Detection of bacteriocin and higher PepX activity in these cheeses was simultaneous

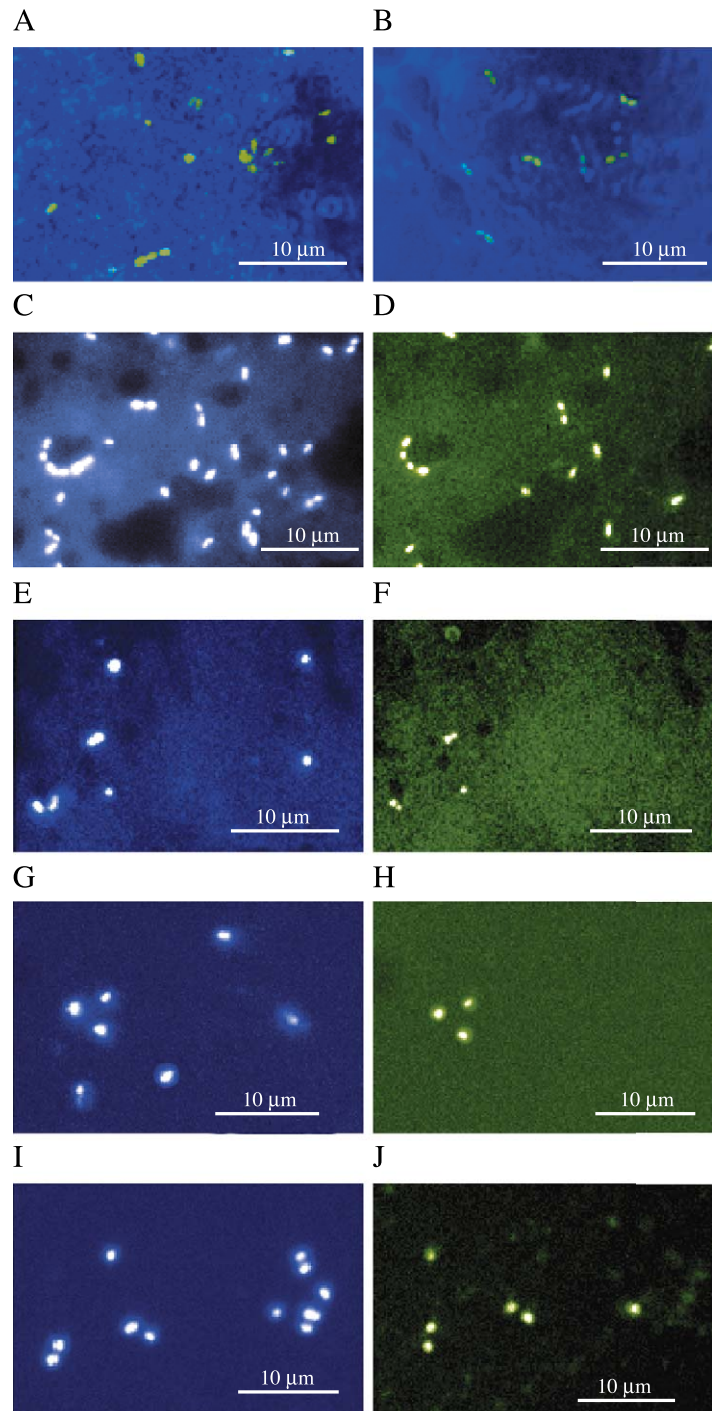


Fig. 4. Analysis by confocal scanning laser microscopy (A and B) and conventional fluorescence microscopy (C through J) during cheese ripening. Images of *L. lactis* IFPL3593-GFP and *L. lactis* IFPL3593-GFP cells (A and B, respectively) in cheese matrixes at 1 day of ripening. Images of DAPI stained bacteria (C, E, G, I), or IFLP3593-GFP cells (D, F, H, J) in a batch Bac+ at 1, 15, 30 and 45 days of ripening.

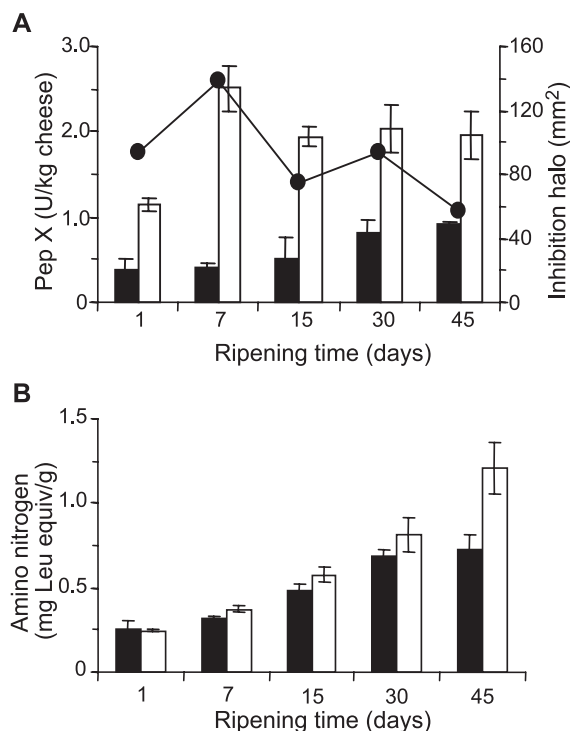


Fig. 5. (A) Release of X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase (PepX) activity during ripening of cheeses manufactured with *L. lactis* IFPL359-GFP (solid bars; non-producing bacteriocin starter) and *L. lactis* IFPL3593-GFP (open bars; Lacticin 3147 producing starter) and Lacticin 3147 activity in cheeses made with *L. lactis* IFPL3593-GFP (●). (B) Amino nitrogen content (expressed as equivalents of leucine per g of cheese) of cheeses manufactured with *L. lactis* IFPL359-GFP (solid bars) and *L. lactis* IFPL3593-GFP (open bars).

with a lower viability of both adjuncts, T1 and IFPL 730 (Fig. 3). The higher PepX activity found in cheeses manufactured with IFPL3593-GFP corresponded with a higher content ( $P < 0.05$ ) of amino nitrogen (Fig. 5B). This result is consistent with previous work on acceleration of proteolysis by IFPL3593 in cheese using T1 as adjunct (Martínez-Cuesta et al., 2001).

### 3.4. Isoleucine catabolism in cheese

To complete the metabolic routes leading to the formation of volatiles in cheese, the adjuncts T1 and IFPL730 were selected based on their complementary action on the catabolism of isoleucine. T1, like its parental strain IFPL359, shows branched chain amino-transferase activity (unpublished results) and is sensi-

tive to Lacticin 3147 (Martínez-Cuesta et al., 1997). IFPL730, is also sensitive to the bacteriocin and is able to decarboxylate  $\alpha$ -keto acids formed by transamination of amino acids into aldehydes (Amárita et al., 2001). Branched chain amino acid catabolism by lactococci is primarily initiated by transamination, since the degradation occurs only in the presence of an  $\alpha$ -keto acid as the amino group acceptor (Yvon et al., 1997). Transamination of isoleucine leads to formation of KMVA. Adding  $\alpha$ -ketoglutarate to the cheese curd enhances conversion of amino acids into aroma compounds in St. Paulin (Yvon et al., 1998) and Cheddar cheeses (Banks et al., 2001). In the present study, isoleucine and the amino group acceptor  $\alpha$ -ketoglutarate were added to the cheese brine, and the isoleucine

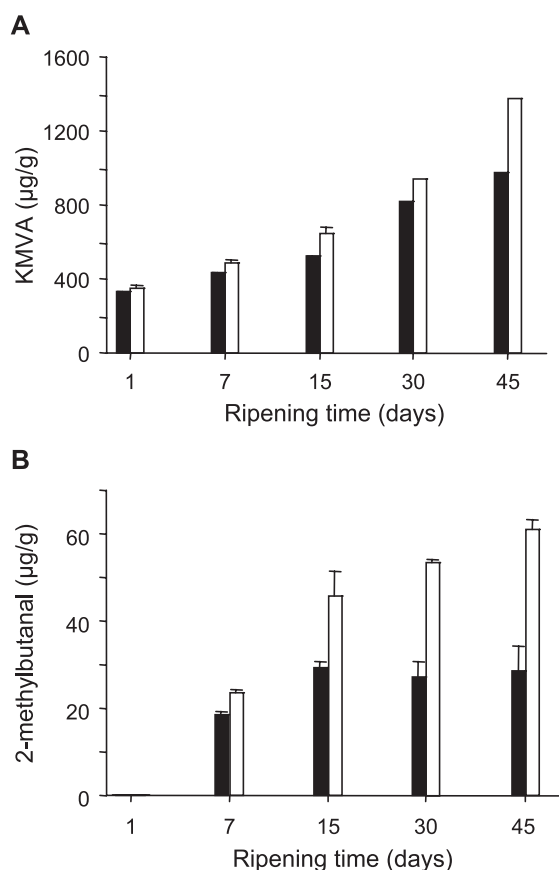


Fig. 6. Production of  $\alpha$ -keto- $\beta$ -methyl- $n$ -valeric acid (KMVA; A) and 2-methylbutanal (B) during ripening of cheeses manufactured with *L. lactis* IFPL359-GFP (solid bars; non-producing bacteriocin starter) and *L. lactis* IFPL3593-GFP (open bars; Lacticin 3147 producing starter).



transamination during ripening was measured by formation of KMVA from isoleucine. Results obtained by HPLC are shown in Fig. 6A. An increase of KMVA values was detected throughout the ripening period, being higher ( $P < 0.05$ ) during ripening of cheeses manufactured with the bacteriocin producer IFPL3593-GFP. This result could be due to the effect of Lacticin 3147 on lactococci, since we have shown that pure cultures of IFPL359 incubated with Lacticin 3147 increased isoleucine transamination due to both membrane permeabilization and cell lysis caused by the bacteriocin (Martínez-Cuesta et al., 2002).

Once KMVA is produced, accumulation of this product turns out to be the limiting factor for complete amino acid conversion. Non-oxidative decarboxylation of KMVA leads to the formation of 2-methylbutanal. In this study, we used as adjunct IFPL730, a strain sensitive to the bacteriocin, which has been shown to produce aldehydes from BCAAs and methionine-derived  $\alpha$ -keto acids (Amárita et al., 2001, 2002). The keto acid decarboxylating activity is not present in the other adjunct strain T1 (not shown). Production of 2-methylbutanal after 7 days of ripening was detected in both batches of cheese (Fig. 6B), and it was higher ( $P < 0.05$ ) in cheeses manufactured with IFPL3593-GFP. Higher formation of KMVA and its subsequent decarboxylation by IFPL730 is considered to be responsible for the higher values of 2-methylbutanal found in the experimental cheeses.

The overall results indicate that the combination of strains used in the present work, showing complementary action on amino acid catabolism, provided an appropriate enzymatic system to produce 2-methylbutanal from isoleucine.

### 3.5. Sensorial analysis

Six trained panelists scored intensity of aroma in homogenates of cheese samples in water from 0 (absent) to 10 (very strong). Results of sensory analysis are shown in Table 2. Increase of aroma development during cheese ripening was significantly ( $P < 0.05$ ) detected after 45 days of ripening. Panelists learned to identify the presence of the compound 2-methylbutanal in the cheese samples using a homogenate of cheese in water containing 2-methylbutanal, as reference. The aroma was defined as intense but not typically cheese-like. The taste threshold of 2-methyl-

Table 2

Aroma evaluation of cheeses manufactured with *L. lactis* IFPL359-GFP (non-producing bacteriocin starter) and with *L. lactis* IFPL3593-GFP (Lacticin 3147-producing starter)

Cheese	Ripening time			
	7 days	15 days	30 days	45 days
IFPL359-GFP	4.3 (1.86) <sup>a,x</sup>	3.4 (0.80) <sup>a,x</sup>	3.9 (1.28) <sup>a,x</sup>	5.9 (1.28) <sup>a,y</sup>
IFPL3593-GFP	2.7 (0.82) <sup>a,x</sup>	2.8 (1.17) <sup>a,x</sup>	4.8 (1.17) <sup>a,y</sup>	7.7 (1.37) <sup>b,z</sup>

Scores are mean values (SD) from 0 (absent) to 10 (very strong). Different letters in the same column (a,b) indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between cheeses at the same time of ripening. Different letters in the same line (z,y,x) indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) during ripening.

butanal has been reported to be 0.13  $\mu\text{g/g}$  (Sheldon et al., 1971).

Aroma conferred by methyl aldehydes has been defined as malty in Cheddar cheese (Morgan, 1976) or spicy in Parmesan cheese (Barbieri et al., 1994). Moreover, methyl aldehyde-producing lactococcal strains have been used to develop new chocolate-like flavours in Gouda cheese (Ayad et al., 2000). It is assumed that a balance of total volatile compounds in cheese during ripening is needed to develop an appropriate cheese flavour. At 45 days of ripening, higher scores ( $P < 0.05$ ) for aroma intensity were given to cheeses manufactured with the bacteriocin-producer IFPL3593-GFP than those manufactured with IFPL359-GFP.

In conclusion, the combination of lactococcal strains showing complementary action on isoleucine transamination and  $\alpha$ -keto acid decarboxylation resulted in formation of 2-methylbutanal from this amino acid. Moreover, the use of a starter producing Lacticin 3147 enhanced microbial enzymatic reactions in cheese and accelerated formation of the volatile amino acid-derived compound. Therefore, an increase of the aroma of cheese was accomplished.

### Acknowledgements

We thank Dr. M. Espinosa and Dr. C. Nieto for kindly providing pMV158GFP plasmid prior to publication, Dr. S.W. Elson for critical reading of the manuscript, and M.A. Ollacariqueta, M.A. Corrales, and D. Salvador for technical assistance.

This work was performed under the auspices of the Consejo Superior de Investigaciones Científicas and was partially supported by Research Projects FEDER-CICYT 2FD97-1025 and AGL 2002-03277. The work at the CIB was partially supported by grant AGL2000-1530-CO2-01, project QLKI-2002-02388 supported by the European Union and the Program of Strategic Groups of the Comunidad de Madrid.

## References

- Amárita, F., Fernández-Esplá, D., Requena, T., Peláez, C., 2001. Conversion of methionine to methional by *Lactococcus lactis*. FEMS Microbiology Letters 204, 189–195.
- Amárita, F., Martínez-Cuesta, M.C., Taborda, G., Soto-Yárrity, P.L., Requena, T., Peláez, C., 2002. Formation of methional by *Lactococcus lactis* IFPL730 under cheese model conditions. European Food Research Technology 214, 58–62.
- Atilas, M.W., Dudley, E., Steele, J., 2000. Gene cloning, sequencing and inactivation of the branched chain aminotransferase of *Lactococcus lactis* LM0230. Applied and Environmental Microbiology 66, 2325–2329.
- Auty, M.A., Gardiner, G.E., McBrearty, S.J., O'Sullivan, E.O., Mulvihill, D.M., Collins, J.K., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., Ross, R.P., 2001. Direct in situ viability assessment of bacteria in probiotic dairy products using viability staining in conjunction with confocal scanning laser microscopy. Applied and Environmental Microbiology 67, 420–425.
- Ayad, E.H., Verheul, A., de Jong, C., Wouters, J.T., Smit, G., 1999. Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. International Dairy Journal 9, 725–735.
- Ayad, E.H., Verheul, A., Wouters, J.T., Smit, G., 2000. Application of wild starter cultures for flavour development in pilot plant cheese making. International Dairy Journal 10, 169–179.
- Ayad, E.H., Verheul, A., Engels, W.J., Wouters, J.T., Smit, G., 2001. Enhanced flavour formation by combination of selected lactococci from industrial and artisanal origin with focus on completion of a metabolic pathway. Journal of Applied Microbiology 90, 59–67.
- Banks, J., Yvon, M., Gripon, J.C., de la Fuente, M.A., Brechany, E.Y., Williams, A., Muir, D.D., 2001. Enhancement of amino acid catabolism in Cheddar cheese using  $\alpha$ -ketoglutarate: amino acid degradation in relation to volatile compounds and aroma character. International Dairy Journal 11, 235–243.
- Barbieri, G., Bolzoni, I., Careri, M., Manglia, A., Parolari, G., Spagonoli, S., Virgili, R., 1994. Study of the volatile fraction of parmesan cheese. Journal of Agricultural and Food Chemistry 42, 1170–1176.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research 7, 1513–1523.
- Burdet, V., 1980. Identification of tetracycline-resistant R-plasmids in *Streptococcus agalactiae* (group B). Antimicrobial Agents and Chemotherapy 18, 753–760.
- Chapot-Chartier, M.P., Deniel, C., Rousseau, M., Vassal, L., Gripon, J.C., 1994. Autolysis of two strains of *Lactococcus lactis* during cheese ripening. International Dairy Journal 4, 251–269.
- Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, A., Steele, J., 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 76, 217–246.
- Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H., Catignani, G.L., 1983. Spectrophotometric assay using *o*-phthaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated proteins. Journal of Dairy Science 66, 1219–1227.
- Fernández de Palencia, P., Nieto, C., Acebo, P., Espinosa, M., López, P., 2000. Expression of green fluorescent protein in *Lactococcus lactis*. FEMS Microbiology Letters 183, 229–234.
- International Dairy Federation, 1982. Cheese and Processed Cheese Products—Determination of Total Solids Content. FIL-IDF Standard 4A, IDF, Brussels.
- International Dairy Federation, 1985. Milk and Milk Products. Methods of Sampling. FIL-IDF Standard 50B, IDF, Brussels.
- Koga, J., Adachi, T., Hidaka, H., 1992. Purification and characterization of indolpyruvate decarboxylase. Journal of Biological Chemistry 267, 15823–15828.
- Kuntz, D.A., Chen, J.L., Pan, G., 1998. Accumulation of  $\alpha$ -ketoacids as essential components in cyanide assimilation by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB11764. Applied and Environmental Microbiology 64, 4452–4459.
- Lacks, S.A., 1968. Genetic regulation of maltosaccharide utilization in *Pneumococcus*. Genetics 60, 685–706.
- Martínez-Cuesta, M.C., Peláez, C., Juárez, M., Requena, T., 1997. Autolysis of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *Lactobacillus casei* ssp. *casei*. Cell lysis induced by a crude bacteriocin. International Journal of Food Microbiology 38, 125–131.
- Martínez-Cuesta, M.C., Fernández de Palencia, P., Requena, T., Peláez, C., 1998. Enhancement of proteolysis by a *Lactococcus lactis* bacteriocin producer in a cheese model system. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46, 3863–3867.
- Martínez-Cuesta, M.C., Kok, J., Herranz, E., Peláez, C., Requena, T., Buist, G., 2000. Requirement of autolytic activity for bacteriocin-induced lysis. Applied and Environmental Microbiology 66, 3174–3179.
- Martínez-Cuesta, M.C., Requena, T., Peláez, C., 2001. Use of a bacteriocin-producing transconjugant as starter in acceleration of cheese ripening. International Journal of Food Microbiology 70, 79–88.
- Martínez-Cuesta, M.C., Requena, T., Peláez, C., 2002. Effect of bacteriocin-induced cell damage on the branched-chain amino acid transamination by *Lactococcus lactis*. FEMS Microbiology Letters 217, 109–113.
- McKay, L.L., Miller III, A., Sandine, W.E., Elliker, P.R. 1970. Mechanisms of lactose by lactic acid streptococci: enzymatic and genetic analysis. Journal of Bacteriology 102, 804–809.
- McSweeney, P.L.H., Sousa, M.J., 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. Lait 80, 293–324.
- Morgan, M.E., 1976. The chemistry of some microbially induced

- flavour defects in milk and dairy foods. *Biotechnology and Bioengineering* 18, 953–965.
- Morgan, S., Ross, P., Hill, C., 1995. Bacteriolytic activity caused by the presence of a novel lactococcal plasmid encoding lactococins A, B, and M. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2995–3001.
- Morgan, S., Ross, P., Hill, C., 1997. Increasing starter cell lysis in Cheddar cheese using a bacteriocin-producing adjunct. *Journal of Dairy Science* 80, 1–10.
- Nierop Groot, M.N., de Bont, J.A.M., 1998. Conversion of phenylalanine to benzaldehyde initiated by an aminotransferase in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3009–3013.
- Nieto, C., Espinosa, M., 2003. Construction of the mobilizable plasmid pMV158GFP, a derivative of pMV158 that carries the gene encoding the green fluorescent protein. *Plasmid* 49, 281–285.
- Nieto, C., Fernández de Palencia, P., López, P., Espinosa, M., 2000. Construction of a tightly plasmid vector for *Streptococcus pneumoniae*: controlled expression of the green fluorescent protein. *Plasmid* 43, 205–213.
- Olalla-Herrera, M., López-García, H., Villalón-Mir, M., López-Martínez, M.C., 1993. Determination by high-performance liquid chromatography of organic acids in Spanish rose wines from the Alpujarra–Contraviesa region of Granada. *Journal of Liquid Chromatography* 16, 3101–3112.
- Requena, T., McKay, L.L., 1993. Plasmid profiles and relationship to lactose utilization/proteinase activity in a lactococcal strain isolated from semi-hard natural cheese. *Milchwissenschaft* 48, 264–268.
- Schmidt, R.H., Davidson, S.M., Lowry, S.P., 1983. Determination of acetaldehyde in *Streptococcus lactis* cultures as 2,4-dinitrophenylhydrazone by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31, 978–980.
- Schure, E.G., Flikweert, M.T., van Dijken, J.P., Pronk, J.T., Verrips, C.T., 1998. Pyruvate decarboxylase catalyzes decarboxylation of branched-chain 2-oxo-acids but is not essential for fusel alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1303–1307.
- Sheldon, R.M., Lindsay, R.C., Libbey, L.M., Morgan, M.E., 1971. Chemical nature of malty flavour and aroma produced by *Streptococcus lactis* var. *maltigenes*. *Applied Microbiology* 22, 263–266.
- Thierry, A., Maillard, M.B., 2002. Production of cheese flavour compounds derived from amino acid catabolism by *Propionibacterium freudenreichii*. *Lait* 82, 17–32.
- Yvon, M., Rijnen, L., 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal* 11, 185–201.
- Yvon, M., Thirouin, S., Rijnen, L., Fromentier, D., Gripon, J.C., 1997. An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavour compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 414–419.
- Yvon, M., Berthelot, S., Gripon, J.C., 1998. Adding  $\alpha$ -ketoglutarate to semi-hard cheese curd highly enhances the conversion of amino acids to aroma compounds. *International Dairy Journal* 8, 889–898.
- Yvon, M., Chambellon, E., Bolotin, A., Roudot-Algaron, F., 2000. Characterization and role of the branched chain aminotransferase (BcaT) isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO763. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 571–577.



## Evidence that the Essential Response Regulator YycF in *Streptococcus pneumoniae* Modulates Expression of Fatty Acid Biosynthesis Genes and Alters Membrane Composition†

M. Luz Mohedano,<sup>1,‡</sup> Karin Overweg,<sup>2,‡</sup> Alicia de la Fuente,<sup>1</sup> Mark Reuter,<sup>2</sup> Silvia Altabe,<sup>3</sup> Francis Mulholland,<sup>2</sup> Diego de Mendoza,<sup>3</sup> Paloma López,<sup>1\*</sup> and Jerry M. Wells<sup>2</sup>

*Departamento de Estructura y Función de Proteínas, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, Spain*<sup>1</sup>; *Institute of Food Research, Norwich Research Park, Norwich, United Kingdom*<sup>2</sup>; and *Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario and Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina*<sup>3</sup>

Received 15 October 2004/Accepted 14 December 2004

**The YycFG two-component system, originally identified in *Bacillus subtilis*, is highly conserved among gram-positive bacteria with low G+C contents. In *Streptococcus pneumoniae*, the YycF response regulator has been reported to be essential for cell growth, but the signal to which it responds and the gene members of the regulon remain unclear. In order to investigate the role of YycFG in *S. pneumoniae*, we increased the expression of *yycF* by using a maltose-inducible vector and analyzed the genome-wide effects on transcription and protein expression during the course of *yycF* expression. The induction of *yycF* expression increased histidine kinase *yycG* transcript levels, suggesting an autoregulation of the *yycFG* operon. Evidence from both proteomic and microarray transcriptome studies as well as analyses of membrane fatty acid composition indicated that YycFG is involved in the regulation of fatty acid biosynthesis pathways and in determining fatty acid chain lengths in membrane lipids. In agreement with recent transcriptome data on pneumococcal cells depleted of YycFG, we also identified several other potential members of the YycFG regulon that are required for virulence and cell wall biosynthesis and metabolism.**

Two-component signal transduction systems (TCSs) seem to be a fundamental constituent of the regulatory organization in bacteria, and they frequently control the expression of virulence factors and adaptive responses (12; reviewed in reference 3). TCSs typically comprise a histidine kinase (HK) in the membrane that senses an environmental stimulus and a cognate response regulator (RR) in the cytoplasm that controls gene expression through binding to DNA promoter sequences. Signal transduction between the sensor protein and the response regulator is achieved by phosphoryl transfer from a histidine residue in the conserved histidine kinase catalytic site to an aspartate residue in the N-terminal receiver domain of the response regulator. Modulation of the phosphorylation state of the RR by the HK is the basis for their effects on the control of gene expression (23).

In the genome of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*, 13 TCSs have been identified, and among them, only YycFG is essential for this bacterium (27, 41). YycFG homologues are found in several gram-positive pathogens (16), and in *S. pneumoniae*, this system has been designated MicAB (14), VicRK (42), and 492hkr (41), but it is referred to here as YycFG.

Gene knockout studies of the 34 TCSs in *B. subtilis* showed that YycFG is the only essential TCS. Both the *yycF* and *yycG*

genes are required for viability (16), as is also the case for *Staphylococcus aureus* (29). However, for *S. pneumoniae*, only the response regulator *yycF* gene was found to be essential (27, 41), suggesting that YycF functions independently of the adjacent histidine kinase YycG, possibly participating in signal transduction with other TCS histidine kinases.

Although the role of YycFG remains unclear, these proteins may have relevance as novel targets for antimicrobial intervention (38). In *S. aureus*, a point mutation in the *yycF* gene conferred temperature-dependent sensitivity to several macrolide and lincosamide antibiotics and also sensitivity to unsaturated long-chain fatty acids, suggesting that this TCS plays a role in cell permeability or the regulation of cell wall and membrane composition (29). In *B. subtilis*, at a nonpermissive temperature, a conditional null mutant of *yycFG* formed chains of cells, some of them lacking cytoplasmic contents (16), whereas the overexpression of YycF led to the production of minicells and a reduction in the cell length as well as a transcriptional induction of the *ftsAZ* cell division operon (17). Further clues that YycF is important for cell division were provided by a hybrid regulator/transcriptome approach in *B. subtilis* (24). This involved the construction of chimeric response regulators by fusing the receiver domain of a regulator of known function with the DNA binding domain of a regulator of unknown function. Thus, microarray analysis under low-phosphate conditions revealed that a gene (*yocH*) encoding a potential autolysin was induced more than fourfold in the presence of the hybrid PhoP-YycF regulator. The identification of the consensus recognition sequence for YycF, consisting of two hexanucleotide direct repeats separated by five nucleotides, enabled 10 genes involved in cell division, cell wall

\* Corresponding author. Mailing address: Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid, Spain. Phone: (34) 918373112, ext. 4202. Fax: (34) 915360432. E-mail: plg@cib.csic.es.

‡ M.L.M. and K.O. contributed equally to this work.

† Supplemental material for this article may be found at <http://jb.asm.org/>.



metabolism, and a membrane-bound transport system to be identified as potential members of the YycFG regulon in *B. subtilis*. Similarly, for *S. aureus*, 12 genes potentially regulated by YycF were identified, including the gene for LytM (a peptidoglycan hydrolase), and binding of YycF to this motif was confirmed in vitro (13). However, none of these genes in *S. aureus* are known to be essential.

The functions controlled by YycFG in *S. pneumoniae* are also not fully understood. Mutation of the putative phosphorylation site in the receiver domain of YycF substantially reduced the stability of YycF-PO<sub>4</sub> in vitro, although a clone carrying this mutation did not show altered growth properties compared to the wild-type strain (14). As stated above, the YycG histidine kinase is not essential in *S. pneumoniae*, although a recent study (32) showed that YycG is conditionally required for growth when levels of YycF are reduced by means of a regulatable promoter. In that study, a microarray analysis of mutants with reduced expression of the YycFG TCS showed an altered expression of 49 genes in 10 clusters, encoding proteins of unknown function or proteins involved in transport, heat shock, the cell surface, carbohydrate metabolism, and amino acid biosynthesis. Of these, *pcsB*, encoding a possible extracellular cell wall hydrolase which is also found in other streptococci, may be the essential target of YycF in *S. pneumoniae*, as its constitutive expression suppressed the essentiality of *yycF*.

It was recently shown through a DNA microarray analysis of *B. subtilis* two-component regulatory systems that overproduction of the response regulator of a two-component system affects the regulation of genes controlled by the system (35). In order to further elucidate the role of YycFG in *S. pneumoniae*, we increased the expression of *yycF* by using a maltose-inducible vector, and here we describe the effects on transcription, protein expression, and fatty acid membrane composition, as determined by the use of DNA microarrays, proteomics, and gas chromatography-mass spectrometry.

## MATERIALS AND METHODS

**Strains, plasmids, and growth conditions.** The *S. pneumoniae* JNR7/87 capsulated strain (40) (The Institute of Genomic Research [http://www.tigr.org]) was used for this work. Cells were grown at 37°C without shaking in AGCH medium (26) supplemented with 0.25% yeast extract (AGCHY) and sucrose and/or maltose at the concentrations indicated in Results. When required, erythromycin was added to the medium at 1 µg ml<sup>-1</sup> (AGCHYE).

The plasmid pPL100 was constructed as follows. The total genomic DNA from strain R61 was used for PCR amplification with the primers rrNheI (5'-TTGG TATAATAGCTAGCAAAAAGGTGAAC-3') and hkNheI (5'-AAAATACTG TATTGCTAGCCTATTTCAC-3') (NheI restriction sites are underlined) to obtain a 765-bp fragment containing the response regulator *yycF* gene and its ribosomal binding site. The PCR product was then digested with NheI and cloned into the unique XbaI site of the pLS1RGFP expression vector, which contains the *gfp* gene cloned under the control of the pneumococcal P<sub>M</sub> promoter and the *malR* gene (33). The resulting plasmid, pPL100, was propagated in *S. pneumoniae* strain R61. Transformants were selected for erythromycin resistance, and the correct nucleotide sequence of the chromosomal insert of pPL100 was confirmed by DNA sequencing. pPL100 was then transferred to the *S. pneumoniae* JNR7/87 capsulated strain by transformation and selection for erythromycin resistance.

**Molecular techniques.** Standard procedures were used for PCR and cloning procedures. Plasmid DNAs were prepared by the method described by Birnboim and Doly (4), with the modifications described by Stassi et al. (37). Sequencing was performed on an ABI PRISM 320 sequencer (Perkin-Elmer).

Competence and transformation procedures for *S. pneumoniae* strain R6 were performed according to the method of Lacks (26). For *S. pneumoniae* strain

JNR7/87, the synthetic competence-stimulating peptide 1 (20) was added to the transformation mixture at a concentration of 25 ng ml<sup>-1</sup>.

**Induction of expression from P<sub>M</sub> promoter.** Uninduced cultures were grown in AGCHYE medium containing 0.8% sucrose. Frozen cultures were diluted 1:1,000 and grown overnight at 37°C until the cultures reached an optical density at 650 nm (OD<sub>650</sub>) of 0.4. Overnight cultures were diluted 1:100 in fresh medium. The cultures were maintained in exponential growth phase by suitable dilutions (at least twice for each experiment) in prewarmed medium so that the cell density was always kept below an OD<sub>650</sub> of 0.4.

Transient induction was performed by a challenge of uninduced cultures with 0.8% maltose for the times indicated in Results. Prior to induction, cells were grown to an OD<sub>650</sub> of 0.4, harvested by centrifugation at 6,700 × g at room temperature, and resuspended in prewarmed fresh AGCHYE medium plus maltose or sucrose.

Long-term induction was performed by growth of the cultures in AGCHYE medium containing 0.8% maltose plus 0.2% sucrose at an OD<sub>650</sub> of 0.4. Long-term induced cultures were obtained and kept in exponential growth phase as uninduced cultures.

After growth, the cultures were harvested by centrifugation at 6,700 × g and washed twice with cold phosphate-buffered saline, pH 8.0 (PBS; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 3 mM KCl). Pellets were stored at -70°C for protein and RNA extraction.

**Measurement of GFP expression.** The expression of green fluorescent protein (GFP) in pneumococcal cells was analyzed as previously described (1). Briefly, cells were harvested by centrifugation, washed, and resuspended to the original volume in PBS. Fluorescence was measured with an LS-50B spectrophotometer (Perkin-Elmer), with excitation at 488 nm with a slit of 2.5 and emission at 511 nm with a slit of 10. As a background, the fluorescence of PBS was subtracted from the fluorescence detected in the samples.

**Preparation of protein extracts.** Frozen pellets from 100-ml cultures were defrosted and resuspended in 4.67 ml of solution 1 (10 mM sodium dodecyl sulfate [SDS], 200 mM dithiothreitol [DTT], 28 mM Tris base, 20 mM Tris-HCl) and 330 µl of solution 2 (24 mM Tris base, 0.47 M Tris-HCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mg of protease-free RNase A [Sigma] ml<sup>-1</sup>, and 10 mg of protease-free DNase I [Roche] ml<sup>-1</sup> in 5 mM CaCl<sub>2</sub>). Total extracts were prepared by passing the cells four times through a French pressure cell at 12,000 lb/in<sup>2</sup>. Cell debris was removed by centrifugation at 13,200 × g for 15 min. The supernatant was divided into aliquots and stored at -70°C.

The total protein concentrations in the extracts were determined by quantification of the protein bands after separation of the proteins in SDS-12.5% polyacrylamide gels and staining with 0.25% Coomassie brilliant blue. Quantification was performed with Quantity One 4.2.1 software in a Gel Doc 2000 molecular analyst (Bio-Rad Laboratories). The Mark 12 unstained standard (Invitrogen) was used as a reference for the protein amounts. For proteomic analysis, bacterial lysates containing 100 µg of protein were analyzed in individual experiments. The proteins were separated in the first dimension by use of a pHaser system (Genomic Solutions) and gel strips for pHs 4.0 to 7.0 (Amersham-Pharmacia) as recommended by the manufacturers, with minor modifications. The proteins were mixed with lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 40 mM Tris base) to a final volume of 50 µl and then with 350 µl of rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 2% IPG buffer [pHs 4.0 to 7.0; Amersham-Pharmacia], 18.2 mM DTT, bromophenol blue). The gel strips were rehydrated with the total volume of 400 µl overnight at 21°C. Electrode wicks were put under the ends of the strips, and the strips were covered with dry-strip cover fluid (Amersham-Pharmacia). The gel strips were run for 24 h. The gel strips were rinsed with MilliQ water and equilibrated in filtered equilibration buffer (56% [vol/vol] Tris-acetate equilibration buffer [pH 7.0; Genomic Solutions], 5% SDS, 6 M urea, 30% glycerol) containing 52 mM DTT for 30 min and then in filtered equilibration buffer containing 1.35 M iodoacetamide for 30 min. The proteins were separated in the second dimension in 10% Duracryl gels. The gels were cast according to the manufacturer's protocol (Investigator 2-D electrophoresis system operating and maintenance manual, Genomic Solutions), except that the glass plates were sealed with silicon (ARBO low-modulus silicone sealant; Adshad Ratcliff & Company Limited). The silicon was allowed to dry for at least 1 day. The gels were kept at 4°C for 1 week to 1 month before use. Second-dimension gels were run according to the manufacturer's protocol (Investigator 2-D electrophoresis system operating and maintenance manual) by the use of cathode buffer (0.2 M Tris-HCl, 0.2 M Tricine, 0.4% SDS), anode buffer (25 mM Tris-acetate), and the Investigator system of Genomic Solutions. The gels were stained with Sypro Ruby (Genomic Solutions) according to the manufacturer's instructions. The proXPRESS proteomic imaging system (Perkin-Elmer) was used for imaging.

The protein spots present in the two-dimensional (2D) gels were quantified

with the PDQuest 2D analysis 7.1.0 program (Bio-Rad Laboratories). For this quantification, 136 stained spots were matched in all gels and used for normalization of the average intensity.

**Mass spectrometric analysis.** The Genomic Solutions Investigator ProPic Robotic Workstation was used to pick spots of interest. Protein spots were washed three times for 20 min each with 100  $\mu$ l of solution A (freshly prepared 80% 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -20% acetonitrile). The gel plugs were washed with 100  $\mu$ l of acetonitrile for 10 to 15 min and then air dried for 10 min. Trypsin (5  $\mu$ l containing 50 ng of trypsin in 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) was added to digest the proteins and incubated at 37°C for 2 to 4 h. The trypsin was inactivated by adding 5% formic acid. The plugs were incubated for 20 min, flash frozen, and stored at -80°C.

For matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis, the spots were analyzed by the John Innes Centre Protein Sequencing Facility. Peptide peak lists were searched against databases of *S. pneumoniae* (Mascot software; Matrix Science).

**RNA preparation and semiquantitative reverse transcriptase PCR (RT-PCR).** RNAs were prepared from 10-ml cultures by use of a QIAGEN RNeasy Midi kit (QIAGEN) according to the manufacturer's procedure. The total RNA concentrations were determined by UV spectrophotometry. The RNAs were checked for their integrity and yield by analysis in a 1% agarose gel. In addition, the quality and quantity of the RNA samples were checked by use of an RNA 6000 Nano assay with an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies) according to the manufacturer's protocol.

Semiquantitative analyses of transcript levels of chromosomal *yycFG* were performed by a two-step RT-PCR assay. The primers used were *yycFG* up (5'-TAGAGCAATTGAAGCAGAGCAACCAGAT-3') and *yycFG* down (5'-ATAAGGGAGTACAATGGTAAAGGTGAAC-3'). RNAs (400 ng) were added to 20- $\mu$ l reverse transcription reaction mixes containing 4  $\mu$ l of cDNA synthesis buffer, 5 mM DTT, 40 U of RNaseOUT (Invitrogen), 1 mM deoxynucleoside triphosphate mix, a 10  $\mu$ M concentration of the appropriate gene-specific primer, and 15 U of Thermo-Script RT (Invitrogen) and then incubated for 60 min at 60°C. Reverse transcription was terminated by incubation at 37°C for 20 min in the presence of 2 U of RNase H (Invitrogen). For the amplification of *yycFG*, 10% of the cDNA synthesis reaction, 50 pmol of each primer, a 500 mM concentration (each) of dATP, dGTP, dTTP, and dCTP, 3.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), and 50 mM KCl were used for each 50- $\mu$ l PCR, which was performed with 2 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). The cycling conditions were as follows: 1 cycle of 94°C for 4 min and 10, 15, 20, 25, and 30 cycles of 94°C for 30 s, 50°C for 30 s, and 72°C for 2 min. Twelve percent of the RT-PCR products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis. The intensities of the PCR products were quantified with Quantity One Gel Doc 2000 software (Bio-Rad Laboratories).

**Construction of *S. pneumoniae* microarray.** DNA fragments of individual open reading frames (ORFs) present in *S. pneumoniae* strain TIGR4 (also known as JNR7/87) and R6 strain-specific genes were amplified by the use of ORF-specific primers (MWG Biotech). The primers (22-mers) were designed according to the approach of Hinds et al. (22), with a predicted melting temperature of 60°C. In total, 2,236 TIGR4 and 117 R6 gene-specific probes were amplified by PCR for spotting onto the microarray. All PCRs were performed with HotStart *Taq* (QIAGEN) and a Primus-HT PCR machine (MWG Biotech) according to the following parameters: 95°C for 15 min, followed by 30 cycles of 95°C for 30 s, 50°C for 30 s, and 72°C for 120 s, with a final incubation at 72°C for 600 s. Genomic TIGR4 and R6 DNAs (2.5 ng) were used as templates, and approximately 100 pmol of each primer was used in a reaction volume of 50  $\mu$ l. For each primer pair, the successful PCR amplification of a single DNA fragment of the correct length was checked by electrophoresis in agarose gels. In the initial high-throughput PCR, a small percentage of reactions (approximately 5%) were either unsuccessful or gave poor yields of product. However, these missing probes were obtained subsequently by optimizing the PCR conditions or by designing new primers. Ten probes carrying ORFs from *Campylobacter jejuni* with no significant DNA sequence homology to *S. pneumoniae* were also included on the array as negative controls. All PCR products were purified by the use of SigmaSpin 2 postreaction clean-up plates (Sigma), dried, and resuspended in half the original volume in 3 $\times$  SSC (1 $\times$  SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate) containing 0.01% Sarkosyl before being spotted onto the microarray. PCR products were spotted onto GAPS II-coated slides (Corning) by use of an in-house Stanford-designed array machine (see <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide> for associated software and protocols). Each glass slide contained two arrays, with each containing two probes (or features) for each gene.

**Fluorescent labeling of RNA and microarray hybridization.** Fifteen micrograms of total purified RNA was mixed with 5  $\mu$ g of random primers and Sigma ultrapure water to a final volume of 12.4  $\mu$ l. The following components were

added: 3  $\mu$ l of 10 $\times$  RT buffer (Stratagene), 0.6  $\mu$ l of 50 $\times$  deoxynucleoside triphosphates (25 mM [each] dATP, dGTP, and dTTP and 10 mM dCTP), 3  $\mu$ l of 0.1 M DTT, 2  $\mu$ l of Cy3 or Cy5 (Amersham-Pharmacia), and 4  $\mu$ l of RT (Stratagene). The reaction mixtures were incubated overnight at 37°C. Reverse transcription reactions were stopped by the addition of 1.5  $\mu$ l of 20 mM EDTA, pH 8.0, and 15  $\mu$ l of freshly made 0.1 M NaOH and by incubation at 70°C for 15 min. Reactions were neutralized by adding 15  $\mu$ l of 0.1 N HCl before purifying the cDNAs with a PCR purification kit (QIAGEN). Eluted cDNAs were concentrated in a Savant SpeedVac and then resuspended in a solution containing 25  $\mu$ l of Sigma ultrapure water, 3  $\mu$ l of human Cot1 DNA (Invitrogen), 6  $\mu$ l of 20 $\times$  SSC, 1  $\mu$ l of 1 M HEPES (pH 7.0), 1  $\mu$ l of 10% SDS, and 4  $\mu$ l of 50 $\times$  Denhardt solution. Hybridization reactions were incubated in boiling water for 2 min and then allowed to cool at room temperature for 10 min before being centrifuged at maximum speed in a bench-top centrifuge for 2 min. The supernatants were carefully removed and placed into fresh tubes, and 40  $\mu$ l was pipetted onto an array. Hybridization reactions were covered with a coverslip (Sigma Hybri-slip) and placed in a hybridization chamber (Gene Machine). Hybridization reactions were incubated overnight at 62°C. Following hybridization, the slides were washed twice for 5 min each in wash buffer 1 (2 $\times$  SSC, 0.1% SDS), twice in wash buffer 2 (1 $\times$  SSC), and twice in wash buffer 3 (0.2 $\times$  SSC) before being dried by centrifuging at 50  $\times$  g for 5 min.

**Microarray data analysis.** Microarray data analysis was conducted on RNAs purified from three independent cultures of each strain. Microarrays were scanned by use of an Axon 4000A microarray scanner, and images were acquired with GenePixPro 3.0 software (Axon). The median feature and background intensities for each feature were imported into GeneSpring 6.0 (Silicon Genetics). Data were normalized by intensity-dependent normalization (LOWESS [9]), and the cross-gene error model was based on replicate measurements. Gene lists were prepared from the genes outside a 1.75-fold cutoff. Gene lists were filtered by rejecting genes with *P* values (derived from one-sample Student's *t* test calculated within GeneSpring) of >0.01, with the exception of genes predicted to be cotranscribed based on a computational prediction of operons (15). Gene lists were further filtered to remove genes that were affected by the expression system, as determined by analyzing microarray data derived from hybridizations with RNAs extracted from strain JNR7/87(pLS1RGFP) grown in the presence or absence of maltose at 5 min and under long-term conditions. The results obtained with this method were in agreement with those obtained by use of an in-house expression analysis tool similar to that described by Pearson et al. (36).

**Analysis of membrane fatty acid composition.** For determinations of the fatty acid composition of the membrane, cells of *S. pneumoniae* JNR7/87(pLS1RGFP) and JNR7/87(pPL100) frozen cultures were diluted 1:1,000 in AGCHYE medium containing 0.8% sucrose and grown overnight at 37°C until reaching an OD<sub>650</sub> of 0.4. Overnight cultures were diluted 1:100 in NOCH medium containing 0.8% maltose, 0.2% sucrose, and erythromycin at 1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>. In this AGCH modified medium, the vitamin-free Casamino Acids were replaced with the following amino acids, each at 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>: Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, and Cys. The casein hydrolysate and serum albumin were reduced, respectively, to 0.05 and 0.01%. This modification was required to minimize the incorporation of fatty acids present in the medium into the pneumococcal membrane. The cultures were maintained in exponential growth phase by dilution twice in fresh medium, keeping the cell density below 0.4. After growth, the cultures were harvested and the pellets were washed with PBS. Total cellular fatty acids were prepared by the method of Bligh and Dyer (5). The fatty acid methyl esters were prepared by the transesterification of glycerolipids with 0.5 M sodium methoxide in methanol (8) and then were analyzed in a capillary column (30 m by 0.25-mm internal diameter) of 100% dimethylpolysiloxane (PE-1; Perkin-Elmer) by use of a Perkin-Elmer Turbo Mass gas chromatograph-mass spectrometer. Helium at 1 ml min<sup>-1</sup> was used as the carrier gas, and the column was programmed to ramp at 4°C min<sup>-1</sup> from 140 to 240°C. Straight-chain fatty acids and unsaturated fatty acids used as reference compounds were obtained from Sigma Chemical Co. The positions of the double bonds in these unsaturated fatty acids were determined by gas chromatography-mass spectrometry. Fatty acid methyl esters were converted to dimethyl disulfide adducts as described previously (44) and then separated in a PE-1 column ramped from 140 to 280°C at 4°C min<sup>-1</sup>. The spectra were recorded in the electron impact mode at 70 eV, with 1-s scans of *m/z* 40 to 400.

## RESULTS

**Construction of *S. pneumoniae* strain JNR7/87(pPL100) and inducible expression of the response regulator YycF-encoding gene.** To construct a vector for the inducible expression of

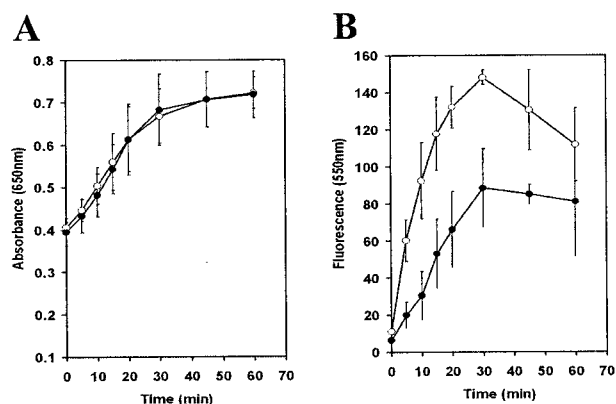


FIG. 1. Growth curve analysis and detection of GFP fluorescence. Cultures of *S. pneumoniae* JNR7/87(pPL100) (●) and JNR7/87(pLS1RGFP) (○) in exponential growth phase were induced with maltose at time point zero. The optical densities of the cultures were measured over time (A). GFP fluorescence was also monitored over time by use of a spectrophotometer (B).

*ycfF*, we clone the gene between the  $P_M$  promoter and the *gfp* reporter gene in the maltose-inducible expression vector pLS1RGFP (33) (see the details of construction in Materials and Methods). In this construct, the downstream *gfp* gene serves as a reporter to monitor inducible promoter activity and the expression of *ycfF*. In addition, the vector encodes the MalR transcriptional regulator (34), which represses expression from the  $P_M$  promoter when maltose is not present in the growth medium. The resulting plasmid, pPL100, was transformed into the capsulated strain *S. pneumoniae* JNR7/87 to create JNR7/87(pPL100). Similarly, JNR7/87 carrying the vector pLS1RGFP [i.e., strain JNR7/87(pLS1RGFP)] was constructed to control for the effects of maltose induction and is universally referred to as the control strain in this study.

Maltose induction did not adversely affect the growth of JNR7/87(pPL100) compared to the control strain over a 60-min period of induction in exponential phase (Fig. 1A). As expected, maltose induction resulted in the expression of GFP in both the JNR7/87(pPL100) and control strains, as shown by spectroscopy (Fig. 1B). Although GFP fluorescence was lower in JNR7/87(pPL100) cells than in control cells, the pattern of GFP expression over time was similar for both strains. Maltose induction resulted in an increase in GFP fluorescence within 5 min, which reached a peak level at 30 min postinduction. The continued growth of JNR7/87(pPL100) in medium containing 0.8% maltose as the sole carbon source substantially impaired growth compared to the growth of this strain in normal medium, presumably due to the effects of the accumulation of YycF. The addition of 0.2% sucrose to the induction medium reduced this adverse effect, and both strains remained in the exponential growth phase to an  $OD_{650}$  of 0.5 or higher. This long-term induction condition (medium containing 0.8% maltose and 0.2% sucrose) was used for further experiments, although cell growth was still affected in JNR7/87(pPL100) (doubling time,  $40.0 \pm 6.2$  min) compared to JNR7/87(pLS1RGFP) (doubling time,  $23.1 \pm 1.7$  min).

**Transcriptional analysis of *S. pneumoniae* after induction of *ycfF*.** Whole-genome microarray comparisons of RNA transcript levels were performed for strain JNR7/87(pPL100) and

the control strain 5 min after induction and after long-term induction. Three separate cultures were used for biological replicates, and on average, data were obtained for 12 features per gene. A complete list of genes with affected transcript levels by YycF induction and their functional classifications after short- and long-term induction are given, respectively, in Table 1 and in Table S1 in the supplemental material. As expected, increased transcript levels of the *ycfF* gene (Sp1227) were detected in strain JNR7/87(pPL100), but not in the control strain, after induction. Apart from this, the major effects on gene transcription were restricted to functions influencing the membrane composition and transport. For example, the expression of 12 of 13 adjacent genes of the fatty acid biosynthetic cluster (Fig. 2B) was significantly altered in strain JNR7/87(pPL100) compared to the control (Fig. 2C), with the transcript levels of *fabK*, *fabD*, *fabG*, *fabF*, *accB*, *fabZ*, *accC*, *accD*, and *accA* (Sp0419 to Sp0427) being increased (Fig. 2C). Decreased expression of the *piaBCDA* (Sp1869 to Sp1872) gene cluster, which is involved in iron transport (also called *pit1BCDA*) and is required for virulence *in vivo* (6, 7), was observed in JNR7/87(pPL100) after short-term induction (Table 1). This result correlates with the induction of this gene cluster by the depletion of YycF (32). Also, the overproduction of YycF resulted in an increase or reduction of transcription of genes encoding transporters (Table 1; also see Table S1 in the supplemental material). Interestingly, the expression of a number of genes with functions related to cell wall biosynthesis and metabolism was affected in response to the long-term overexpression of *ycfF* (see Table S1 in the supplemental material). The endo-beta-*N*-acetylglucosamidase gene *lytB* (Sp0965); the essential gene *pscB* (Sp2216), encoding a putative cell wall hydrolase (32); SP2021, encoding a putative glycosyl hydrolase; and two other genes containing a LysM-encoding domain (Sp0107 and Sp2063) were expressed at higher levels in strain JNR7/87(pPL100) than in the control.

In addition, the overproduction of YycF also resulted in increased levels (5.5- and 7.1-fold after short- and long-term induction, respectively) of the cognate histidine kinase (*ycyG*) transcript (Sp1226), which in *S. pneumoniae* R61, is cotranscribed with *ycfF* (Sp1225) (32, 42). The induction of the chromosomal *ycyFG* genes was verified by a semiquantitative RT-PCR with one set of primers spanning the *ycfF* and *ycyG* genes. RNA samples prepared from JNR7/87(pPL100) and the control strain before and after 10- and 30-min inductions with maltose were reverse transcribed by use of a primer specific to the chromosomally located *ycyG* gene to avoid reverse transcription of the *ycfF* transcripts that originated from the plasmid. After reverse transcription and removal of the RNA, the bicistronic cDNA encoding YycF and YycG was amplified by PCR (Fig. 3). Quantification of the amplified DNA fragments detected after 20, 25, and 30 PCR cycles revealed that before induction (time zero), the levels of the chromosomal *ycyFG* transcript were similar ( $1.20 \pm 0.07$ -fold variation) in both strains analyzed. However, after 10 and 30 min of induction, the levels of the *ycyFG* mRNA were  $2.17 \pm 0.26$ - and  $4.10 \pm 0.42$ -fold higher, respectively, in JNR7/87(pPL100) than in JNR7/87(pLS1RGFP). In addition, induction for 10 and 30 min resulted in  $1.61 \pm 0.03$ - and  $2.84 \pm 0.03$ -fold increased levels of the TCS transcript in strain JNR7/87(pPL100), but not in the vector control strain. These results support the



TABLE 1. Genes with significantly different transcript levels in JNR7/87(pPL100) and JNR7/87(pLS1RGFP) cells after short-term maltose induction

Functional category	TIGR4 no.	Gene product (gene)	Ratio <sup>a</sup>	P value
Fatty acid metabolism	Sp0419	Enoyl-(acyl carrier protein) reductase ( <i>fabK</i> )	1.965	9.67E-08
	Sp0420	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase ( <i>fabD</i> )	2.022	4.15E-06
	Sp0421	3-Oxoacyl-[acyl carrier protein] reductase ( <i>fabG</i> )	1.893	1.73E-03
	Sp0422	3-Oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase II ( <i>fabF</i> )	1.796	5.93E-05
	Sp0423	Acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxyl carrier protein ( <i>accB</i> )	1.855	1.96E-03
	Sp0424	Hydroxymyristoyl-(acyl carrier protein) dehydratase ( <i>fabZ</i> )	2.027	1.04E-06
	Sp0425	Acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase ( <i>accC</i> )	2.007	5.51E-07
	Sp0426	Acetyl-CoA carboxylase, carboxyl transferase, $\beta$ subunit ( <i>accD</i> )	1.861	7.74E-06
	Sp0427	Acetyl-CoA carboxylase, carboxyl transferase, $\alpha$ subunit ( <i>accA</i> )	2.098	1.06E-05
	Sp1226 <sup>b</sup>	Histidine kinase ( <i>yycG</i> )	5.466	1.39E-10
Regulation	Sp1227 <sup>b</sup>	Response regulator ( <i>yycF</i> )	3.366	3.24E-05
	Sp1799	Sugar-binding transcriptional regulator, LacI family	0.541	9.19E-02
Transport	Sp0042	Competence factor transporting permease protein ComA ( <i>comA</i> )	1.992	1.25E-03
	Sp1682	Sugar ABC transporter, permease protein	0.556	1.98E-02
	Sp1683	Sugar ABC transporter, sugar-binding protein	0.469	2.53E-03
	Sp1684	PTS system, IIBC components	0.440	7.03E-03
	Sp1869 <sup>b</sup>	Iron ABC transporter, permease protein ( <i>piaB</i> )	0.514	8.75E-04
	Sp1870 <sup>b</sup>	Iron ABC transporter, permease protein ( <i>piaC</i> )	0.535	8.92E-03
	Sp1871 <sup>b</sup>	Iron ABC transporter, ATP-binding protein ( <i>piaD</i> )	0.538	5.87E-04
	Sp1872 <sup>b</sup>	Iron ABC transporter, iron binding protein ( <i>piaA</i> )	0.579	5.49E-02
	Sp1884	Trehalose PTS system, IIBC components	0.264	9.00E-05
	Sp1883	Dextran glucosidase DexS, putative	0.392	1.24E-02
Energy metabolism	Sp2148	Arginine deiminase ( <i>arcA</i> )	0.303	2.11E-04
	Sp2150	Ornithine carbamoyltransferase ( <i>argF</i> )	0.419	7.19E-04
	Sp2166	L-Fucose phosphate aldolase ( <i>fucA</i> )	0.533	5.06E-02
	Sp2167	L-Fucose kinase fucK, putative	0.328	6.09E-03
	Sp0125	Hypothetical protein	2.355	3.30E-04
Hypothetical	Sp1685	Conserved hypothetical protein	0.461	1.90E-02

<sup>a</sup> Genes with >1.75-fold expression changes between JNR7/87(pPL100) and JNR7/87(pLS1RGFP) were selected.

<sup>b</sup> Also detected by Ng et al. after depletion of YycF (32).

observation that the promoter for the chromosomal operon is induced by increased expression of *yycF* carried by the plasmid pPL100. Reactions containing no RT were included in the analysis to confirm the absence of DNA contamination.

**Proteomic analysis of *S. pneumoniae* after YycF overproduction.** To investigate the proteomic response of *S. pneumoniae* to *yycF* induction, we harvested JNR7/87(pPL100) and the control strain for protein extraction after induction for 5 or 30 min and after long-term induction. Three independent samples were analyzed by 2D gel electrophoresis, Sypro Ruby staining, and fluorescence imaging. Representative images containing approximately 400 distinct protein spots are shown in Fig. 4 for JNR7/87(pPL100) and the control strain for long-term induction. Differences in protein expression were quantified with PDQuest image analysis software. Nineteen protein spots with altered expression in JNR7/87(pPL100) compared to the control (indicated in Fig. 4) were excised from the gels, digested with trypsin, and identified by MALDI-TOF MS using the protein mass fingerprint technique and the Mascot search tool (Matrix Science). The identified proteins, their predicted functions, and their changes in expression level, as judged by the quantification of protein fluorescence, are summarized in Table 2.

Only one protein, the Sp1804 product, was reduced in JNR7/87(pPL100) compared to the control at all times after induction. This protein is a homologue of protein 24 (Gls24) of *Enterococcus faecalis*, and in that host is involved in general stress resistance (19).

As anticipated, an increased amount of the YycF protein was detected in JNR7/87(pPL100) at all time points postinduction. Two protein spots corresponding to the response regulator were identified (spots indicated with "RR\*" and "RR" in Fig. 4B) in JNR7/87(pPL100). The more positively charged spot (RR) was more abundant than the more negatively charged protein spot (RR\*) (3.3-, 6.9-, and 3.4-fold more abundant after 5-min, 30-min, and long-term induction). The increase in RR levels (reaching the maximum after 30 min of induction) was similar to that observed for GFP (Fig. 1B and data not shown).

At all time points postinduction, 18 protein spots (including the two isoforms of RR) were increased in JNR7/87(pPL100) compared to the control strain (Table 2). These were identified as seven proteins involved in fatty acid biosynthesis (AccABC and FabKDGF, encoded by Sp0419 to Sp0425 and Sp0427), the translation elongation factor Tu (Sp1489 gene product), four proteins involved in purine biosynthesis (PurCMHB, encoded by Sp0044, Sp0047, Sp0050, and Sp0056), the formate tetrahydrofolate ligase (FTHFL, the Sp1229 gene product), which generates a substrate for PurH, and one protein involved in pyrimidine biosynthesis (CarB, the Sp1275 gene product). Fifty percent of these proteins were also found by transcriptome analysis after the short-term induction of *yycF*. The regulatory protein for the pyrimidine operon (PyrR, the Sp1278 gene product) and the ribonucleoside-diphosphate reductase 2  $\beta$  subunit (NrdF, the Sp1180 gene product), which is involved in purine ribonucleotide biosynthesis, were also increased in

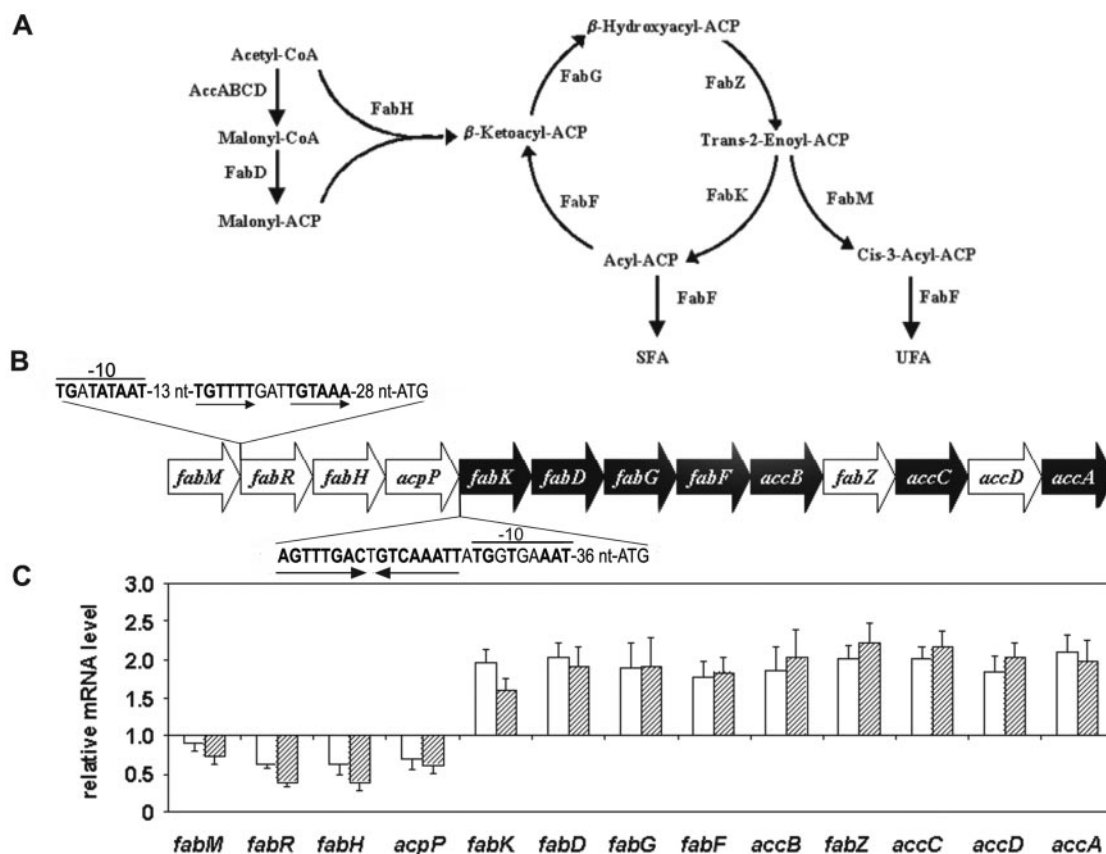


FIG. 2. Fatty acid biosynthesis in *S. pneumoniae*. (A) Pathway of saturated (SFA) and unsaturated (UFA) fatty acid biosynthesis in pneumococci. (B) Pneumococcal biosynthetic gene cluster. Black arrows indicate genes with increased protein levels, as detected by proteomic analysis. Putative promoters for *fabR*, *fabH*, and *acpP* and for *fabK*, *fabD*, *fabG*, *fabF*, *accB*, *fabZ*, *accC*, *accD*, and *accA* as well as putative operators for YycF (two hexanucleotide direct repeats) and FabR (one inverted repeat) are depicted. Nucleotides matching consensus sequences are shown in bold. (C) Relative mRNA expression levels of fatty acid biosynthesis genes in strain JNR7/87(pPL100) compared to the control strain after 5-min (white bars) and long-term (shaded bars) induction. The lengths of the error bars represent the standard deviations from the means.

JNR7/87(pPL100), but only 5 and 30 min after induction, not during long-term induction.

The increased levels of PurCMHB as well as of CarB and PyrR (Table 2) correlated with the microarray analysis of cells grown in the presence of maltose, by which the increased transcription of genes included in the Pur (*purC* and *vanZ*) as well as in the Pyr (*carBA* and *pyrB*) operon was detected (results not shown). These data suggest that the overexpression of *yycF* results in an increase in mRNA synthesis, probably devoted to protein synthesis since increased levels of the elongation factor Tu were also detected in the YycF overproducer strain.

**Effects of *yycF* induction on membrane fatty acid composition.** Both the proteomic and transcriptome analyses pointed to an increase in expression of the fatty acid biosynthetic genes *fabK*, *fabD*, *fabG*, *fabF*, *accB*, *fabZ*, *accC*, *accD*, and *accA* (Sp0419 to Sp0427) after the induction of *yycF*, suggesting that there may be a change in the composition of the membrane. Accordingly, the fatty acid membrane composition of the control and JNR7/87(pPL100) strains were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry after growth in medium containing 0.2% sucrose and 0.8% maltose. The results are depicted in Table 3. The *S. pneumoniae* membrane consists

primarily of straight-chain, 16- and 18-carbon saturated and unsaturated fatty acids (28). In the control strain, the ratio of 18-carbon fatty acids ( $C_{18:0}$ ,  $C_{18:1\Delta 9}$ ,  $C_{18:1\Delta 11}$ , and  $C_{18:1\Delta 13}$ ) to 16-carbon fatty acids ( $C_{16:0}$ ,  $C_{16:1\Delta 7}$ ,  $C_{16:1\Delta 9}$ , and  $C_{16:1\Delta 11}$ ) was 1.16. However, the strain overexpressing *yycF* produced a relatively larger proportion of  $C_{18}$  fatty acids, increasing the total  $C_{18}/C_{16}$  ratio to 1.83. A lower ratio of  $C_{18}$  to  $C_{16}$  fatty acids was also observed for the control strain when the unsaturated and saturated forms of these fatty acids were compared separately (Table 3). The ratios of total unsaturated to saturated fatty acids were very similar for the control and JNR7/87(pPL100) strains, calculated as 1.10 and 1.12, respectively. These data therefore support the conclusion that the overproduction of YycF ultimately impacts the membrane composition.

## DISCUSSION

We have investigated the role of the response regulator protein YycF in *S. pneumoniae* by proteome and transcriptome analyses over time following the induction of *yycF* expression. To do this, we cloned *yycF* and a downstream *gfp* reporter gene downstream of the maltose-inducible promoter  $P_M$  in plasmid pPL100, which was then transformed into *S. pneumoniae*

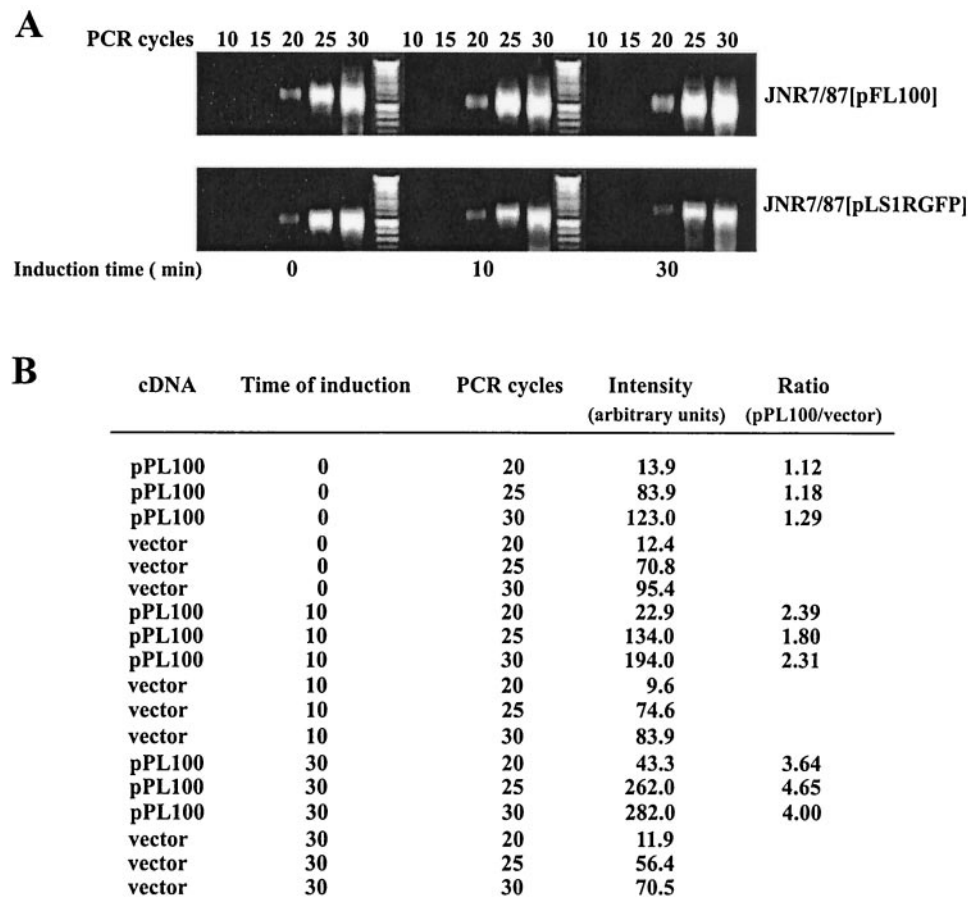


FIG. 3. Semiquantitative RT-PCR analysis of the *yycFG* genes. (A) Agarose gel analysis of RT-PCR products from RNAs extracted from exponential cultures of JNR7/87(pPL100) and the control strain grown with sucrose (time zero) or induced with maltose for 10 and 30 min. PCRs were performed for 10, 15, 20, 25, and 30 cycles. (B) Quantification of RT-PCR products shown in panel A. The intensities of the bands were measured, and ratios were calculated by dividing the intensity values of RT-PCR products from JNR7/87(pPL100) (pPL100) and JNR7/87(pLS1RGFP) (vector) at each induction time and each number of PCR cycles.

JNR7/87. The induction of YycF expression from P<sub>M</sub> in JNR7/87(pPL100) was confirmed by an increase in fluorescence due to GFP, by the increased amounts of YycF detected on 2D protein gels, and by higher *yycF* transcript levels (2.9- to 4.4-fold) than those in the control strain.

The two YycF proteins that were identified on 2D gels from extracts derived from induced JNR7/87(pPL100) were not detected in the control strain, indicating that this response regulator is normally present in small amounts during in vitro culture. This is in agreement with the work of Wagner et al. (42), who showed that the transcript of the *yycF* gene was not detected by Northern blotting with an RNA prepared from *S. pneumoniae* cells grown to exponential or early stationary phase. Based on the pIs of the two YycF proteins of JNR7/87(pPL100), we suggest that the more negatively charged spot is the phosphorylated form of the regulator. Notably, the more positively charged spot of YycF was present in larger amounts (3.3- to 6.9-fold) than the more negatively charged species. The induction of YycF resulted in increased transcription of the chromosomal cognate sensor kinase gene (*yycG*), which is located in the same operon (42). A semiquantitative PCR analysis of transcripts encoding YycFG in the control and *yycF*-

overexpressing strains (Fig. 3) confirmed that the transcription of both genes was induced upon YycF overproduction. These results indicate that the response regulator autoregulates the expression of the YycFG TCS system. The increased expression of YycG histidine kinase may be responsible for the presence of the putative phosphorylated YycF detected on 2D gels. However, an interaction between YycF and other histidine kinases present in pneumococci cannot be ruled out, since it has been shown that YycF can act as a phosphoacceptor for a heterologous histidine kinase from the *E. faecalis* VanR/VanS TCS in vitro (42). The same authors showed that in *S. pneumoniae*, *yycF* is cotranscribed with the downstream cognate histidine kinase *yycG* gene.

Proteomic studies revealed that 17 proteins were increased in strain JNR7/87 when YycF was overproduced (Table 2). The relative transcript levels of a similar number of genes (11) were also elevated at 5 min postinduction of *yycF* (Table 1). For a variety of reasons (e.g., protein solubility, the sensitivity of techniques, and translational control), the results of proteomic and microarray transcription analyses were expected to be different, but nevertheless, 50% of the affected proteins were identified by both techniques, giving credence to the results.

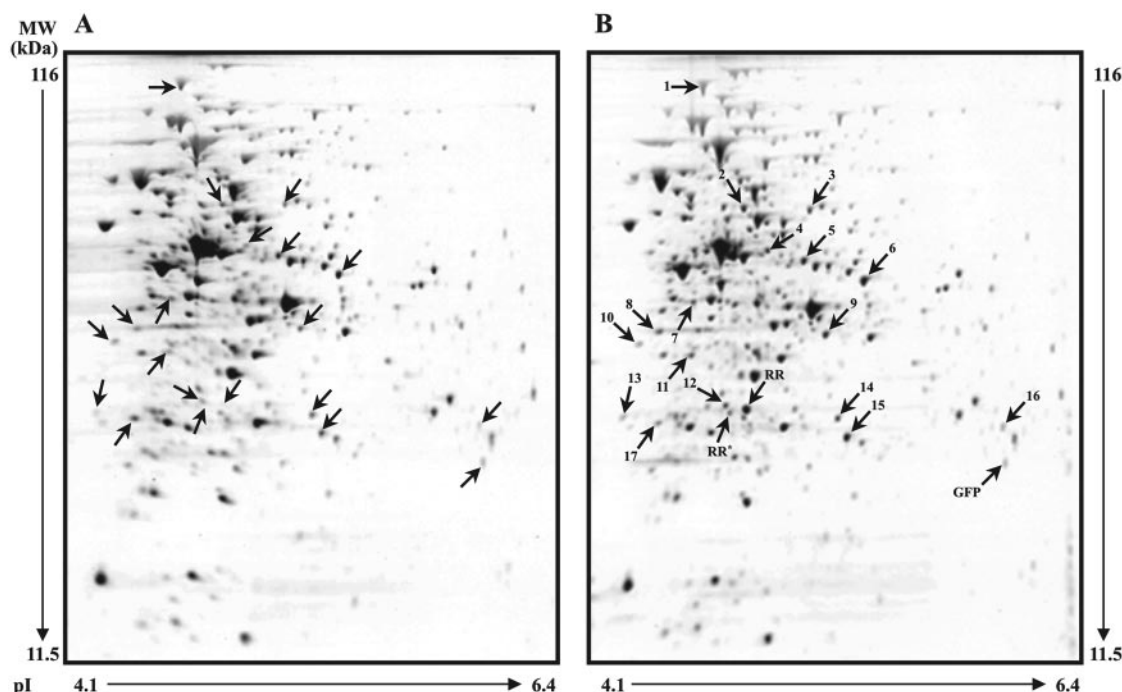


FIG. 4. Proteomic analysis of long-term maltose induction of *S. pneumoniae* strains JNR7/87(pLS1RGFP) and JNR7/87(pPL100). Protein extracts of long-term induced JNR7/87(pLS1RGFP) (control strain) (A) and JNR7/87(pPL100) (B) cultures were analyzed by 2D gel electrophoresis as described in the text. Arrows indicate polypeptides that were present in increased and decreased amounts in JNR7/87(pPL100) compared to the control. The numbers correspond to those used for the proteins listed in Table 2. The GFP spot is also indicated.

The most interesting aspect of our studies was that the proteomic and transcription profiling data provided evidence that the YycFG TCS directly or indirectly controls the expression of the fatty acid biosynthetic pathway (Fig. 2A). Proteomics showed that seven proteins (FabK, FabD, FabG, FabF, and AccBCA) from the fatty acid biosynthesis cluster were present in significantly higher levels in strain JNR7/87(pPL100) than in the control strain after induction. This was corroborated by the microarray transcriptome data, which showed that the expression of the genes for these seven proteins was also increased, and additionally, there was increased expression of *fabZ* and *accD*. The transcriptome data also showed a reduction of expression of *fabR*, *fabH*, and *acpP* after the induction of *yycF* (Fig. 2C). In bacteria, fatty acid biosynthesis is performed by a set of individual enzymes known as the type II or dissociated fatty acid synthase system (reviewed in reference 21). Chains of 16- and 18-carbon saturated and monounsaturated fatty acids are the main end products of the pathway and constitute the hydrophobic portions of the membrane phospholipids.

The FabK, FabG, FabZ, and FabF proteins are all involved in the repetitive series of processes that are necessary for the sequential addition of malonyl-coenzyme A (CoA) molecules to the growing hydrocarbon chain during fatty acid biosynthesis (during this series of events, the malonate is decarboxylated, and thus the chain elongates two carbons at a time). The AccABCD proteins form a multisubunit enzyme responsible for the synthesis of malonyl-CoA from acetyl-CoA. Thus, all of the proteins associated with fatty acid chain elongation were overproduced, at the protein and/or transcript level, in JNR7/87(pPL100). However, *acpP* encodes the acyl carrier protein

(ACP), which is the fundamental starting point for fatty acid biosynthesis. FabH is responsible for condensing acetyl-CoA with malonyl-ACP to form  $\beta$ -ketobutyryl-ACP, which is the starter molecule for subsequent chain elongation. FabR is a DNA binding protein belonging to the MarR family of transcriptional regulators (2) and may play a regulatory role in the production of fatty acid elongation genes (see below). *fabR*, *fabH*, and *acpP*, all showed a decrease in transcription in JNR7/87(pPL100) after the induction of *yycF*. Therefore, it appears that genes involved in fatty acid starter unit production have reduced expression after *yycF* induction, whereas those involved with chain elongation have elevated expression. This metabolic imbalance may explain why the  $C_{18}$  to  $C_{16}$  fatty acid ratio (Table 3) was increased in JNR7/87(pPL100) compared to the control strain.

It has been well established that a lipid bilayer that is completely in a liquid crystalline state has the best prerequisites for maintaining the integrity and the permeability barrier of the membrane and for supporting the full activity of membrane-associated enzymes and transport proteins (31). However, the membrane fluidization temperature has been shown to increase with the effective chain length, which is proportional to the thickness of the well-packed hydrocarbon region (10). Our results indicate that YycF plays a role in determining the membrane composition, and it seems plausible that the unbalanced synthesis of long-chain fatty acids contributes to the abnormal septation observed with strain JNR7/87(pPL100) (results not shown), as it has been reported that the degree of membrane fluidity seems to be important for cell division site selection (30).



TABLE 2. Proteins affected by YycF induction, as detected by proteomic analysis

Functional2 category	Protein <sup>a</sup>	Spot no.	Ratio of induction <sup>b</sup>			TIGR4 no.	Score (%) <sup>c</sup>	Coverage (%) <sup>d</sup>	pI	Molecular mass (kDa)
			5 min	30 min	Long-term					
Fatty acid metabolism	FabK <sup>e</sup>	9	2.25	2.20	2.00	Sp0419	110	46	5.12	34.156
	FabD <sup>e</sup>	11	1.56	1.91	1.40	Sp0420	95	38	4.45	33.184
	FabG <sup>e</sup>	15	2.39	2.57	1.84	Sp0421	207	68	5.34	25.739
	FabF <sup>e</sup>	6	1.49	1.74	1.75	Sp0422	52	13	5.45	44.075
	AccB <sup>e</sup>	13	2.05	2.02	1.93	Sp0423	53	32	4.17	17.023
	AccC <sup>e</sup>	4	1.34	1.44	1.57	Sp0425	123	34	4.85	49.793
	AccA <sup>e</sup>	16	2.74	2.51	1.80	Sp0427	73	18	6.31	28.230
Regulation	RR <sup>e</sup>	RR	>16.20	>39.22	>33.08	Sp1227	171	42	4.78	24.265
	RR*	RR*	>4.90	>5.65	>9.75	Sp1227	207	48	4.71	23.251
Purine and pyrimidine biosynthesis	PurC <sup>e</sup>	12	1.22	1.57	1.87	Sp0044	220	66	4.64	27.043
	PurM	7	1.32	1.15	1.24	Sp0047	95	27	4.45	36.502
	PurH	2	1.39	1.21	1.62	Sp0050	162	28	4.75	56.316
	PurB	5	1.39	1.65	1.17	Sp0056	249	54	5.03	49.617
	CarB <sup>e</sup>	1	1.32	1.35	1.51	Sp1275	224	27	4.52	116.499
	PyrR	14	1.29	1.39	0.99	Sp1278	158	56	5.16	19.597
	NrdF	10	1.24	1.61	0.98	Sp1180	117	37	4.18	36.961
Central intermediary metabolism	FTHFL	3	1.42	1.81	1.65	Sp1229	134	25	5.09	59.806
Protein synthesis	EF Tu	8	1.98	1.86	1.30	Sp1489	197	42	4.60	43.943
Stress	Gls24	17	0.76	0.61	0.43	Sp1804	200	69	4.33	21.803

<sup>a</sup> AccA, acetyl-CoA carboxylase carboxyl transferase alpha subunit; AccB, acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein; AccC, acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase; CarB, carbamoyl-phosphate synthase, large subunit; EF-Tu, translation elongation factor Tu; FabD, malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase; FabF, oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase II; FabG, 3-oxoacyl-(acyl carrier protein) reductase; FabK, enoyl-(acyl carrier protein) reductase; FTHFL, formate tetrahydrofolate ligase; Gls24, hypothetical general stress protein 24; NrdF, ribonucleoside diphosphate reductase 2,  $\beta$  subunit; PurB, adenylosuccinate lyase; PurC, phosphoribosyl-aminimidazole succino-carboxamide synthase; PurH, phosphoriboxyl-aminimidazole-carboxamide-formyltransferase/IMP cyclohydrolase; PurM, phosphoribosylformylglycineamidase cycloligase; and PyrR, pyrimidine operon regulatory protein.

<sup>b</sup> Ratios were calculated by dividing the mean values of the spot intensities (from three independent experiments) obtained for JNR7/87(pPL100) and JNR7/87(pLS1RGFP). The mean values and standard deviations of the spot intensities are depicted in Table S2 in the supplemental material.

<sup>c</sup> The score is  $-10\log(P)$ , where  $P$  is the probability that the observed match is a random event.

<sup>d</sup> Coverage is the ratio of amino acids (no. identified in peptides/no. in theoretical peptides from sequence data) expressed as a percentage.

<sup>e</sup> Alterations of expression were also detected by microarray analysis.

Marrakchi et al. (28) proposed that, in *S. pneumoniae*, FabR might synchronously regulate its own expression in addition to that of *fabM* and *fabK*, since a putative operator for *fabR* was identified upstream of each of the three genes. Our transcriptome data also suggest that *fabK*, *fabD*, *fabG*, *fabF*, *accB*, *fabZ*, *accC*, *accD*, and *accA* are coordinately regulated, because the changes in expression of these genes follow the same pattern after the induction of YycF. Likewise, the transcription of *fabR*, *fabH*, and *acpP* might be coregulated, as they show comparable decreases in transcription after YycF induction. In contrast, *fabM*, the first gene within the fatty acid biosynthetic gene cluster, was not significantly affected after YycF induction (Fig. 2C) and thus might be independently regulated. The two hexanucleotide direct repeats (Fig. 2B), deviating in only one nucleotide from the consensus sequence (5'-TGTAH<sub>5</sub>TG TWAH-3'), of the YycF operators of *B. subtilis* and *S. aureus* (13, 24) were only identified upstream of *fabR*. In addition, an inverted repeat binding motif of the winged-helix motif of the MarR regulator (2) was identified adjacent to the -10 region of the putative promoter of fatty acid elongation genes. Thus, it is possible that both YycF and FabR, acting as a transcriptional repressor, may play a role in a regulatory cascade of the fatty acid biosynthetic genes.

In this study, we provided evidence from both proteomic and microarray transcription studies, as well as from an analysis of membrane fatty acid compositions, that in *S. pneumoniae* YycFG is involved in the regulation of the fatty acid biosynthesis pathways and in modulating the chain lengths of fatty acids.

TABLE 3. Fatty acid composition of total membrane lipid extracts from *S. pneumoniae* JNR/87(pLS1RGFP) and JNR7/87(pPL100)

Fatty acid(s) or ratio <sup>a</sup>	% of total fatty acid in indicated strain <sup>b</sup>	
	JNR7/87(pLS1RGFP)	JNR7/87(pPL100)
<b>SFAs</b>		
<i>n</i> -12:0	0.68 $\pm$ 0.26	0.19 $\pm$ 0.06
<i>n</i> -14:0	3.94 $\pm$ 0.45	2.28 $\pm$ 0.51
Anteiso-15:0	0.11 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.03
<i>n</i> -16:0	32.10 $\pm$ 1.76	29.83 $\pm$ 2.48
Iso-17:0	0.06 $\pm$ 0.04	0.28 $\pm$ 0.03
Anteiso-17:0	0.63 $\pm$ 0.07	0.59 $\pm$ 0.03
<i>n</i> -18:0	11.30 $\pm$ 1.80	15.06 $\pm$ 0.76
$\Sigma$ SFAs	48.82 $\pm$ 4.39	48.35 $\pm$ 3.90
18:0/16:0	0.35 $\pm$ 0.04	0.50 $\pm$ 0.01
<b>UFAs</b>		
<i>n</i> -14:1	0.34 $\pm$ 0.10	0.09 $\pm$ 0.04
<i>n</i> -16:1 $\Delta$ 7	2.11 $\pm$ 0.46	0.76 $\pm$ 0.10
<i>n</i> -16:1 $\Delta$ 9	9.49 $\pm$ 1.99	3.35 $\pm$ 0.42
<i>n</i> -16:1 $\Delta$ 11	1.23 $\pm$ 0.30	0.94 $\pm$ 0.24
$\Sigma$ 16:1	12.83 $\pm$ 2.75	5.05 $\pm$ 0.76
<i>n</i> -18:1 $\Delta$ 9	5.33 $\pm$ 0.72	5.11 $\pm$ 0.28
<i>n</i> -18:1 $\Delta$ 11	33.78 $\pm$ 1.76	41.04 $\pm$ 2.30
<i>n</i> -18:1 $\Delta$ 13	1.71 $\pm$ 0.25	2.77 $\pm$ 0.16
$\Sigma$ 18:1	40.82 $\pm$ 2.73	48.92 $\pm$ 2.74
$\Sigma$ UFAs	53.65 $\pm$ 5.48	53.97 $\pm$ 3.50
18:1/16:1	3.18 $\pm$ 0.49	9.68 $\pm$ 0.93

<sup>a</sup> SFA, saturated fatty acid; UFA, unsaturated fatty acid.

<sup>b</sup> Mean values and standard deviations of six independent experiments are depicted.

This finding is in agreement with a report by Martin et al. (29), who showed that a temperature-sensitive lethal mutant of *S. aureus* carrying a point mutation in *yycF* was more sensitive to macrolide and lincosamide antibiotics and unsaturated fatty acids. Macrolide susceptibility has also been shown to increase markedly in mutants involved in phospholipid biosynthesis, and it was proposed that YycF may have a role in the regulation of membrane composition. Alterations in the expression of fatty acid biosynthesis genes were not reported in a recent study by Ng et al. (32), in which changes in transcription patterns were characterized for *S. pneumoniae* cells depleted of *yycFG* expression. The most likely explanation for this lies in the fact that Ng et al. (32) only compiled a list of genes with changes of more than twofold in their relative transcript amounts, whereas we statistically analyzed all genes showing reproducible changes in transcript amounts of >1.75-fold in triplicate experiments. However, in common with the YycF depletion approach taken by Ng et al. (32), we found an increased expression of several genes involved in the stress response (e.g., *grpE*, *dnaK*, *hrcA*, and *groEL*) after long-term induction. Therefore, these transcriptional changes are presumably due to the physiological stresses provoked by the prolonged depletion or overexpression of YycF and not to direct control by the regulator. Most interestingly, the relative transcript levels of *lytB*, a cell wall hydrolase gene, and *pcsB* (a possible extracellular cell wall hydrolase gene) were both substantially increased in response to an increased expression of YycF (shown here) but were substantially decreased during YycF depletion (32), strongly suggesting that YycF plays a role in the regulation of these genes.

The relative transcript levels of other genes that might play a role in the biosynthesis or degradation of the cell envelope, such as *mreC* and two genes containing LysM domains (Sp0107 and Sp2063), were also affected by the induction of YycF expression. Interestingly, in *B. subtilis* YycF specifically activates the expression of *yocH*, which encodes a potential autolysin (24). The YycF protein in *B. subtilis* also seems to modulate the expression of *ftsAZ* (17, 24). However, in *S. pneumoniae* the *ftsAZ* cell division operon was not affected by the induction or repression of *yycF* expression (32; this work), suggesting that YycF might not regulate this operon as reported for *B. subtilis* (24).

The histidine kinase YycG contains a putative PAS/PAC domain near the cytoplasmic N terminus that has been shown in other proteins to be associated with responses to changes in redox potential, light, oxygen, or energy levels (18, 39, 41). Echenique and Trombe (14) suggested that the phosphorylated form of YycF in *S. pneumoniae* is involved in competence repression under microaerobiosis. Mutation of the PAS domain in YycG abolishes its kinase activity and allows the expression of competence under microaerobic conditions. Also, Kadioglu et al. (25) proposed that the YycFG TCS of the pneumococcus is involved in the adaptive response of the bacteria to changes in oxygen levels. Interestingly, changes in the fatty acid compositions of membrane lipid pools have been observed to occur in *S. aureus* cells transitioning between aerobic growth and anaerobic growth (43). Therefore, we suggest that this TCS regulates the membrane composition in response to oxygen and possibly other stimuli, such as redox potential and energy levels, via the PAS/PAC sensing domain in YycFG.

In addition, we have identified other potential members of the YycF regulon that are required for virulence, such as the iron transport system *pia* and several genes such as *lytB*, *pscB*, and Sp0107 that might play a role in cell wall biosynthesis and metabolism. In support of this hypothesis, a putative consensus DNA binding motif (5'-TGTHHHN<sub>2</sub>TTGTHDH-3') for YycF was found upstream of these genes as well as of *fabR* (Fig. 2C) and *yycF* in the StreptoPneumoList database (<http://genolist.pasteur.fr>).

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. A. Corrales and M. Hourcade for technical assistance. We thank Stephen Elson for a critical reading of the manuscript.

This work was supported by European Union grant QLK2-CT-2000-00543 and also benefited from European Bacterial Proteomic Thematic Network grant QLK2-CT-2000-01536. The work at the CIB was performed under the auspices of the Consejo Superior de Investigaciones Científicas and was partially supported by grant 08.2/0051.1/2001 of CAM to P.L., the Thematic Network of Spanish Cooperative Research grant FISC03/14, and grant P1040808 of FIS. The work at IBR was supported by a grant of the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica del Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCYT). D.M. is a career investigator from Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, Argentina) and an international scholar of the Howard Hughes Medical Institute.

#### REFERENCES

1. Acebo, P., C. Nieto, M. A. Corrales, M. Espinosa, and P. López. 2000. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* cells harbouring single or multiple copies of the green fluorescence protein. *Microbiology* **146**:1267–1273.
2. Alekshun, M. N., S. B. Levy, T. R. Mealy, B. A. Seaton, and J. F. Head. 2001. The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **8**:710–714.
3. Alves, R., and M. A. Savageau. 2003. Comparative analysis of prototype two-component systems with either bifunctional or monofunctional sensors: differences in molecular structure and physiological function. *Mol. Microbiol.* **48**:25–51.
4. Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513–1523.
5. Bligh, E. G., and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Med. Sci.* **37**:911–917.
6. Brown, J. S., S. M. Gilliland, and D. W. Holden. 2001. A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. *Mol. Microbiol.* **40**:572–585.
7. Brown, J. S., and D. W. Holden. 2002. Iron acquisition by gram-positive bacterial pathogens. *Microbes Infect.* **4**:1149–1156.
8. Christie, W. 1989. Gas chromatography and lipids. The Oily Press, Ayr, Scotland.
9. Cleveland, W. S., and S. J. Devlin. 1988. Locally-weighted regression: an approach to regression analysis by local fitting. *J. Am. Stat. Assoc.* **83**:596–610.
10. Cronan, J. E., and E. P. Gelmann. 1975. Physical properties of membrane lipids: biological relevance and regulation. *Bacteriol. Rev.* **39**:232–256.
11. Davis, M. S., and J. E. Cronan, Jr. 2001. Inhibition of *Escherichia coli* acetyl coenzyme A carboxylase by acyl-acyl carrier protein. *J. Bacteriol.* **183**:1499–1503.
12. Dietz, P., G. Gerlach, and D. Beier. 2002. Identification of target genes regulated by the two-component system HP166-HP165 of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **184**:350–362.
13. Dubrac, S., and T. Msadek. 2004. Identification of genes controlled by the essential YycG/YycF two-component system of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **186**:1175–1181.
14. Echenique, J. R., and M. C. Trombe. 2001. Competence repression under oxygen limitation through the two-component MicAB signal transducing system in *Streptococcus pneumoniae* and involvement of the PAS domain of MicB. *J. Bacteriol.* **183**:4599–4608.
15. Ermolaeva, M. D., O. White, and S. L. Salzberg. 2001. Prediction of operons in microbial genomes. *Nucleic Acids Res.* **29**:1216–1221.
16. Fabret, C., and J. A. Hoch. 1998. A two-component signal transduction system essential for growth of *Bacillus subtilis*: implications for anti-infective therapy. *J. Bacteriol.* **180**:6375–6383.
17. Fukuchi, K., Y. Kasahara, K. Asai, K. Kobayashi, S. Moriya, and N. Ogasawara. 2000. The essential two component regulatory system encoded by *yycF* and *yycG* modulates expression of the *ftsAZ* operon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **146**:1573–1583.

18. Galperin, M. Y., A. N. Nikolskaya, and E. V. Koonin. 2001. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**:11–21.
19. Giard, J. C., A. Rince, H. Capioux, Y. Auffray, and A. Hartke. 2000. Inactivation of the stress- and starvation-inducible *gls24* operon has a pleiotrophic effect on cell morphology, stress sensitivity, and gene expression in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **182**:4512–4520.
20. Havarstein, L. S., P. Gaustad, I. F. Nes, and D. A. Morrison. 1996. Identification of the streptococcal competence-pheromone receptor. *Mol. Microbiol.* **21**:863–869.
21. Heath, R. J., S. W. White, and C. O. Rock. 2001. Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. *Prog. Lipid Res.* **40**:467–497.
22. Hinds, J., A. A. Witney, and J. K. Vass. 2002. Microarray design for bacterial genomes, p. 67–82. *In* B. W. Wren and N. Dorrell (ed.), *Methods in microbiology: functional microbial genomics*. Academic Press, London, United Kingdom.
23. Hoch, J. A., and T. J. Silhavy (ed.). 1995. *Two-component signal transduction*. ASM Press, Washington, D.C.
24. Howell, A., S. Dubrac, K. K. Andersen, D. Noone, J. Fert, T. Msadek, and K. Devine. 2003. Genes controlled by the essential YycG/YycF two-component system of *Bacillus subtilis* revealed through a novel hybrid regulator approach. *Mol. Microbiol.* **49**:1639–1655.
25. Kadioglu, A., J. Echenique, S. Manco, M. C. Trombe, and P. W. Andrew. 2003. The MicAB two-component signaling system is involved in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **71**:6676–6679.
26. Lacks, S. 1968. Genetic regulation of maltosaccharide utilization in *Pneumococcus*. *Genetics* **60**:685–706.
27. Lange, R., C. Wagner, A. de Saizieu, N. Flint, J. Molnos, M. Stieger, et al. 1999. Domain organization and molecular characterization of 13 two-component systems identified by genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* **237**:223–234.
28. Marrakchi, H., K. H. Choi, and C. O. Rock. 2002. A new mechanism for anaerobic unsaturated fatty acid formation in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **277**:44809–44816.
29. Martin, P. K., T. Li, D. Sun, D. P. Biek, and M. B. Schmid. 1999. Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **181**:3666–3673.
30. Mileykovskaya, E., I. Fishov, X. Fu, B. D. Corbin, W. Margolin, and W. Dowhan. 2003. Effects of phospholipid composition on MinD-membrane interactions in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **278**:22193–22198.
31. Morein, S., A. Andersson, L. Rilfors, and G. Lindblom. 1996. Wild-type *Escherichia coli* cells regulate the membrane lipid composition in a “window” between gel and non-lamellar structures. *J. Biol. Chem.* **271**:6801–6809.
32. Ng, W. L., G. T. Robertson, K. M. Kazmierczak, J. Zhao, R. Gilmour, and M. E. Winkler. 2003. Constitutive expression of PcsB suppresses the requirement for the essential VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae* R6. *Mol. Microbiol.* **50**:1647–1663.
33. Nieto, C., P. Fernández de Palencia, P. López, and M. Espinosa. 2000. Construction of tightly regulated plasmid vector for *Streptococcus pneumoniae*: controlled expression of the green fluorescent protein. *Plasmid* **43**:205–213.
34. Nieto, C., A. Puyet, and M. Espinosa. 2001. MalR-mediated regulation of the *Streptococcus pneumoniae* malMP operon at promoter *P<sub>M</sub>*. Influence of a proximal divergent promoter region and competition between MalR and RNA polymerase proteins. *J. Biol. Chem.* **276**:14946–14954.
35. Ogura, M., H. Yamaguchi, K. Yoshida, Y. Fujita, and T. Tanaka. 2001. DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* DegU, ComA and PhoP regulons: an approach to comprehensive analysis of *B. subtilis* two-component regulatory systems. *Nucleic Acids Res.* **29**:3804–3813.
36. Pearson, B. M., C. Pin, J. Wright, K. P. Anson, T. Humphrey, and J. M. Wells. 2003. Comparative genome analysis of *Campylobacter jejuni* using whole genome DNA microarrays. *FEBS Lett.* **554**:224–230.
37. Stassi, D. L., P. Lopez, M. Espinosa, and S. A. Lacks. 1981. Cloning of chromosomal genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:7028–7032.
38. Stephenson, K., and J. A. Hoch. 2002. Virulence- and antibiotic resistance-associated two-component signal transduction systems of gram-positive pathogenic bacteria as targets for antimicrobial therapy. *Pharmacol. Ther.* **93**:293–305.
39. Taylor, B. L., and I. B. Zhulin. 1999. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:479–506.
40. Tettelin, H., K. E. Nelson, I. T. Paulsen, J. A. Eisen, T. D. Read, S. Peterson, et al. 2001. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **293**:498–506.
41. Throup, J. P., K. K. Koretke, A. P. Bryan, K. A. Ingraham, A. F. Chalker, Y. Ge, et al. 2000. A genomic analysis of two component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **35**:566–576.
42. Wagner, C., A. de Saizieu, H. J. Schönfeld, M. Kamber, R. Lange, C. J. Thompson, and M. G. Page. 2002. Genetic analysis and functional characterization of the *Streptococcus pneumoniae* vic operon. *Infect. Immun.* **70**:6121–6128.
43. White, D. C., and F. E. Frerman. 1968. Fatty acid composition of complex lipids in *Staphylococcus aureus* during formation of the membrane-bound electron transport system. *J. Bacteriol.* **95**:2198–2209.
44. Yamamoto, K., A. Shibahara, T. Nakayama, and G. Kajimoto. 1991. Determination of double-bond positions in methylene-interrupted dienoic fatty acids by GC-MS as their dimethyl disulfide adducts. *Chem. Phys. Lipids* **60**:39–50.

**Table S1.** Genes with transcript levels significantly different in JNR7/87[pPL100] and JNR7/87[pLS1RGFP] cells after long-term induction.

Functional category	TIGR4 (No)	Gene product (gene)	Ratio <sup>1</sup>	P-value
Fatty acid and phospholipid metabolism	Sp0416	transcriptional regulator, MarR family ( <i>fabR</i> )	0.402	2.60E-04
	Sp0417	3-oxoacyl- (acyl-carrier-protein) synthase III ( <i>fabH</i> )	0.395	4.48E-03
	Sp0420	malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase ( <i>fabD</i> )	1.897	5.19E-04
	Sp0421	3-oxoacyl- [acyl-carrier protein] reductase ( <i>fabG</i> )	1.898	8.40E-03
	Sp0423	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxyl carrier protein ( <i>accB</i> )	2.022	2.29E-03
	Sp0424	hydroxymyristoyl- (acyl-carrier-protein) dehydratase ( <i>fabZ</i> )	2.209	2.43E-05
	Sp0425	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase ( <i>accC</i> )	2.162	9.53E-06
	Sp0426	acetyl-CoA carboxylase, carboxyl transferase, $\beta$ subunit ( <i>accD</i> )	2.027	1.24E-05
	Sp0427	acetyl-CoA carboxylase, carboxyl transferase, $\alpha$ subunit ( <i>accA</i> )	1.962	7.90E-04
	Sp2222	CDP-diacylglycerol-glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase ( <i>pgsA</i> )	0.549	8.77E-04
Regulatory	Sp1226 <sup>2</sup>	sensory box sensor histidine kinase ( <i>yycG</i> )	7.056	4.31E-15
	Sp1227 <sup>2</sup>	DNA-binding response regulator ( <i>yycF</i> )	5.131	7.72E-08
	Sp1799	sugar-binding transcriptional regulator, LacI family	0.353	5.66E-03
Transport				
	Sp1527	Oligopeptide ABC transporter, oligopeptide-binding protein AliB ( <i>aliB</i> )	3.479	1.47E-05
	Sp1587	oxalate:formate antiporter	1.832	8.23E-04
	Sp1602	phnA protein ( <i>phnA</i> )	0.574	5.30E-03
	Sp1640	manganese ABC transporter, permease protein ( <i>psaC</i> )	2.042	1.97E-04
	Sp1884	trehalose PTS system, IIABC components	0.373	5.07E-03
	Sp2022 <sup>2</sup>	PTS system, IIC component	2.132	2.99E-05
	Sp2219	ABC transporter permease protein	0.579	2.42E-02
	Sp2220	ABC transporter, ATP-binding protein	0.464	3.16E-03
	Sp2221	ABC transporter, ATP-binding protein	0.437	5.78E-03
Cell envelop				
	Sp0107 <sup>2</sup>	LysM domain protein	3.592	4.52E-07
	Sp0641 <sup>2</sup>	serine protease, subtilase family	2.142	5.08E-03
	Sp0965 <sup>2</sup>	endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase ( <i>lytB</i> )	8.544	5.43E-09
	Sp2021	glycosyl hydrolase, family 1 ( <i>bgI2</i> )	2.175	1.90E-06
	Sp2063	LysM domain protein	7.941	5.60E-08
	Sp2216 <sup>2</sup>	putative cell wall hydrolase ( <i>pcsB</i> )	2.613	1.35E-07
	Sp2218	rod shape-determining protein MreC ( <i>mreC</i> )	0.364	1.13E-04
Purine and pyrimidine biosynthesis				
	Sp0044	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase ( <i>purC</i> )	2.180	1.04E-04
	Sp0049	vanZ protein, putative ( <i>vanZ</i> )	1.812	2.09E-04
	Sp0964	dihydroorotate dehydrogenase B ( <i>pyrDb</i> )	1.892	5.80E-06
	Sp1275	carbamoyl-phosphate synthase, large subunit ( <i>carB</i> )	1.784	6.04E-04
	Sp1276	carbamoyl-phosphate synthase, small subunit ( <i>carA</i> )	1.700	2.87E-02
	Sp1277	aspartate carbamoyltransferase ( <i>pyrB</i> )	2.012	4.30E-05
Heat shock and stress				
	Sp0515 <sup>2</sup>	heat-inducible transcription repressor HrcA ( <i>hrcA</i> )	2.151	6.87E-04
	Sp0516 <sup>2</sup>	heat shock protein GrpE ( <i>grpE</i> )	2.245	3.72E-03
	Sp0517 <sup>2</sup>	dnaK protein ( <i>dnaK</i> )	3.734	4.02E-03
	Sp1906 <sup>2</sup>	chaperonin, 60 kDa ( <i>groEL</i> )	2.196	3.99E-03



Protein synthesis and degradation	Sp1029	RNA methyltransferase, TrmA family	2.428	4.84E-03
	Sp1343	prolyl oligopeptidase family protein	2.055	5.01E-05
	Sp2223 <sup>2</sup>	conserved hypothetical protein	0.555	1.07E-02
	Sp2224 <sup>2</sup>	peptidase, M16 family	0.424	6.39E-04
	Sp2225 <sup>2</sup>	putative protease	0.281	1.07E-04
Central intermediary metabolism	Sp0918	spermidine synthase ( <i>speE</i> )	2.561	7.02E-04
	Sp0919	conserved hypothetical protein	2.043	1.13E-04
	Sp0920	carboxynorspermidine decarboxylase ( <i>nspC</i> )	3.047	3.17E-06
Energy metabolism	Sp1190	tagatose 1,6-diphosphate aldolase ( <i>lacD</i> )	2.543	4.20E-05
	Sp1191	tagatose-6-phosphate kinase ( <i>lacC</i> )	2.186	3.60E-04
	Sp1192	galactose-6-phosphate isomerase, LacB subunit ( <i>lacB</i> )	2.581	5.86E-06
	Sp1853	galactokinase ( <i>galK</i> )	2.215	2.50E-06
	Sp1883	dextran glucosidase DexS, putative	0.412	8.09E-03
Biosynthesis of cofactors	Sp0177	riboflavin synthase, alpha subunit ( <i>ribE</i> )	2.664	1.96E-04
Hypothetical	Sp0125	hypothetical protein	1.906	4.35E-06
	Sp0171	ROK family protein	1.916	3.14E-03
	Sp0917	pilin gene inverting-related protein	1.881	5.46E-06
	Sp0922	carbon-nitrogen hydrolase family protein	2.774	2.12E-04
	Sp1093	hypothetical protein	2.711	6.19E-03
	Sp1601	conserved hypothetical protein	0.629	2.59E-02
	Sp1739	KH domain protein	0.494	3.47E-04
	Sp2061 <sup>2</sup>	conserved hypothetical protein	2.469	4.13E-04

<sup>1</sup>Genes with >1.75 fold expression changes between in JNR7/87 [pPL100] and JNR7/87[pLS1RGFP] were selected.

<sup>2</sup>Genes also detected by Ng *et al.* by depletion of YycF (32).

**Table S2.** The proteins affected by pPL100 overexpression detected through 2D gel analysis

	Spot	5 min induction			30 min induction			Long-term induction		
		pPL100 <sup>1</sup>	Vector <sup>1</sup>	Ratio <sup>2</sup>	pPL100 <sup>1</sup>	Vector <sup>1</sup>	Ratio <sup>2</sup>	pPL100 <sup>1</sup>	Vector <sup>1</sup>	Ratio <sup>2</sup>
Fatty acid metabolism										
	FabK	7459±1741	3312±1021	2.25	8207±918	3729±1101	2.20	7482±201	3738±87	2.00
	FabD	6484±340	4156±91	1.56	7311±2083	3818±1409	1.91	6598±1001	4726±135	1.40
	FabG	11278±100	4726±884	2.39	12769±2494	4970±664	2.57	11208±2343	6098±1646	1.84
	FabF	10625±398	7143±498	1.49	10299±729	5908±1431	1.74	13525±2381	7737±514	1.75
	AccB	5049±739	2462±397	2.05	3754±693	1857±46	2.02	3058±27	1587±609	1.93
	AccC	3982±347	2969±383	1.34	4224±402	2933±384	1.44	4169±703	2649±297	1.57
	AccA	3866±618	1409±235	2.74	2445±460	975±355	2.51	2846±82	1581±51	1.80
Regulatory										
	RR	7879±359	<486	>16.20	19062±7229	<486	>39.22	16077±2598	<486	>33.08
	RR*	2380±345	<486	> 4.90	2746±341	<486	> 5.65	4743±319	<486	> 9.75
Purine and pyrimidine biosynthesis										
	PurC	4592±420	3752±804	1.22	5110±969	3263±500	1.57	5462±1053	2924±306	1.87
	PurM	7256±703	5509±249	1.32	7677±1085	6673±41	1.15	6468±170	5223±1128	1.24
	PurH	6554±1331	4721±95	1.39	7462±1251	6169±45	1.21	6783±22	4191±624	1.62
	PurB	7295±1326	5258±830	1.39	9070±2326	5502±584	1.65	7331±1312	6254±368	1.17
	CarB	7442±1494	5614±270	1.32	7679±119	5679±1297	1.35	9139±562	6041±562	1.51
	PyrR	4501±47	3474±112	1.29	4733±631	3394±424	1.39	4476±55	4505±19	0.99
	NrdF	3313±368	2666±400	1.24	3384±385	2092±645	1.61	2425±457	2461±457	0.98
Central Intermediary metabolism										
	FTHFL	3826±1215	2685±240	1.42	4886±1467	2705±231	1.81	5734±1437	476±639	1.65
Protein synthesis										
	EF-Tu	5179±537	2618±245	1.98	7140±772	3839±270	1.86	6453±769	4973±471	1.30
Stress										
	Gls24	7029±622	9165±1641	0.76	7388±43	11976±1773	0.61	4222±500	9890±2245	0.43

Abbreviations of the names of these polypeptides are described in the legend of Table 2.

<sup>1</sup>Intensity of the spots obtained for JNR7/872[pPL100] (pPL100) and JNR7/872[pLS1RGFP] (vector) after subtraction of their backgrounds and subsequent normalisation. The mean value and the standard deviation of three 2D-gels are depicted.

<sup>2</sup>The ratios were calculated by dividing the mean values of the spots intensities (from three independent experiments) obtained for JNR7/87[pPL100] and JNR7/87[pLS1RGFP].

